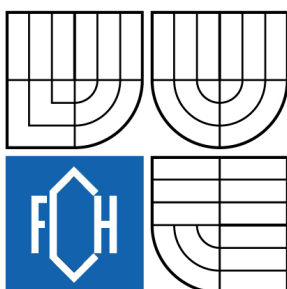




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZAVEDENÍ METODY STANOVENÍ KONJUGOVANÉ LINOLOVÉ KYSELINY (CLA)

INTRODUCTION OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID
(CLA)

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

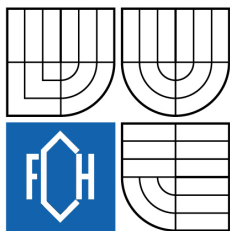
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LENKA RUPRICOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

| | | |
|------------------------------|--|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | FCH-DIP0249/2008 | Akademický rok: 2008/2009 |
| Ústav: | Ústav chemie potravin a biotechnologií | |
| Student(ka): | Bc. Lenka Ruprichová | |
| Studijní program: | Chemie a technologie potravin (N2901) | |
| Studijní obor: | Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010) | |
| Vedoucí diplomové práce: | Ing. Eva Vítová, Ph.D. | |
| Konzultanti diplomové práce: | | |

Název diplomové práce:

Zavedení metody stanovení konjugované linolové kyseliny (CLA)

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled o:
 - vzniku a výskytu CLA v živočišných materiálech
 - biologických účincích v lidském organismu
 - metodách vhodných pro stanovení CLA
2. Vypracujte a validujte metodu stanovení CLA ve vybraných biologických matricích
3. Zhodnoťte výhody této metody a její použitelnost

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lenka Ruprichová
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá optimalizací metody stanovení konjugované linolové kyseliny (CLA) plynovou chromatografií. V teoretické části je zpracován přehled o vzniku a výskytu CLA v živočišných materiálech, biologických účincích v lidském organismu a metodách vhodných pro stanovení CLA.

Experimentální část ověřuje, zda je metoda plynové chromatografie vhodná pro stanovení konjugované kyseliny linolové ve vybraných biologických matricích. A dále se zabývá podmínkami stanovení a optimalizací metody na FCH VUT v Brně. Na závěr je zde posouzena použitelnost metody ve vztahu k CLA.

ABSTRACT

This work deals with the optimization of the method for determination of conjugated linoleic acid (CLA) using gas chromatography. The summary about formation and occurrence of CLA in animal materials, its biological effects in human organism and methods suitable for its determination is introduced in the theoretical part of this study.

The experimental part verify, if the gas chromatography is applicable method for assesment of CLA in selected biological matrices. The chosen method was introduced and verified at FCH of Brno university of technology. At the end the applicability of this method to CLA determination is discussed here.

KLÍČOVÁ SLOVA

Konjugovaná linolová kyselina, plynová chromatografie.

KEYWORDS

Conjugated linoleic acid, gas chromatography.

RUPRICHOVÁ, L. Zavedení metody stanovení konjugované linolové kyseliny (CLA) . Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ:

Děkuji Ing. Evě Vítové, Ph.D. za pomoc a odborné vedení během psaní mé diplomové práce a RNDr. Hannieli Dubskému CSc. za ochotu a cenné rady.

Lenka Ruprichová

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD | 11 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 2.1 Mastné kyseliny | 12 |
| 2.1.1 Struktura a názvosloví | 12 |
| 2.1.1.1 Nasycené kyseliny | 12 |
| 2.1.1.2 Nenasycené kyseliny s jednou dvojnou vazbou | 13 |
| 2.1.1.3 Kyseliny s dvěma a více dvojnými vazbami | 14 |
| 2.1.1.4 Alkinové, rozvětvené a cyklické kyseliny | 15 |
| 2.1.1.5 Kyseliny s další kyslíkatou funkční skupinou | 15 |
| 2.1.1.6 Jiné kyseliny | 16 |
| 2.1.2 Metabolismus mastných kyselin | 16 |
| 2.1.2.1 Syntéza v lidském těle | 16 |
| 2.1.2.2 Výživa a metabolismus esenciálních mastných kyselin | 17 |
| 2.1.2.3 Odbourávání v organismu | 17 |
| 2.1.3 Výskyt | 17 |
| 2.1.3.1 Nasycené kyseliny | 18 |
| 2.1.3.2 Nenasycené kyseliny | 18 |
| 2.1.4 Vlastnosti | 20 |
| 2.2 Konjugovaná kyselina linolová | 21 |
| 2.2.1 Struktura a názvosloví | 21 |
| 2.2.2 Výskyt a vlastnosti CLA | 22 |
| 2.2.3 Biosyntéza CLA | 23 |
| 2.2.4 Metabolismus CLA | 25 |
| 2.2.5 Fyziologické účinky CLA | 25 |
| 2.2.5.1 Vliv CLA na hubnutí | 26 |
| 2.2.5.2 CLA a rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění | 27 |
| 2.2.5.3 CLA a diabetes typu II | 28 |
| 2.2.5.4 CLA a karcinogeneze | 28 |
| 2.2.5.5 CLA a funkce imunitního systému | 30 |
| 2.2.5.6 Vliv CLA na kosti | 30 |
| 2.2.6 CLA v lidské tkáni | 30 |
| 2.2.7 Obsah CLA v potravinách | 31 |
| 2.2.6.1 Odhad alimentárního příjmu CLA | 33 |
| 2.2.6.2 Stabilita CLA při skladování | 34 |
| 2.2.8 Obohacování potravin CLA | 34 |
| 2.2.8.1 Mléko a mléčné výrobky | 35 |
| 2.2.8.2 Přezvýkavci | 36 |
| 2.2.8.3 Prasata | 37 |
| 2.2.8.4 Drůbež | 38 |
| 2.2.8.5 Králíci | 39 |
| 2.2.8.6 Ryby | 39 |
| 2.2.8.7 Rostlinné oleje | 39 |
| 2.2.9 Analytické stanovení CLA | 40 |
| 2.3 Plynová chromatografie | 42 |
| 2.3.1 Princip | 42 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.3.2 | Instrumentace plynového chromatografu..... | 42 |
| 2.3.2.1 | Zdroj nosného plynu..... | 42 |
| 2.3.2.2 | Čisticí zařízení..... | 42 |
| 2.3.2.3 | Regulační systém..... | 43 |
| 2.3.2.4 | Dávkovač..... | 43 |
| 2.3.2.5 | Kolona..... | 43 |
| 2.3.2.6 | Termostat..... | 43 |
| 2.3.2.7 | Detektor..... | 44 |
| 2.3.2.8 | Vyhodnocovací zařízení..... | 44 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 45 |
| 3.1 | Laboratorní vybavení..... | 45 |
| 3.1.1 | Chemikálie..... | 45 |
| 3.1.2 | Plyny..... | 45 |
| 3.1.3 | Přístroje..... | 45 |
| 3.1.4 | Pracovní pomůcky..... | 45 |
| 3.2 | Použité standardy a vzorek..... | 45 |
| 3.2.1 | Standard č. 1..... | 45 |
| 3.2.2 | Standard č. 2..... | 46 |
| 3.2.3 | Vzorek..... | 46 |
| 3.3 | Příprava..... | 46 |
| 3.3.1 | Příprava standardu..... | 46 |
| 3.3.2 | Příprava vzorku..... | 46 |
| 3.4 | Analýza methylesterů mastných kyselin..... | 47 |
| 3.5 | Metrologické charakteristiky metody..... | 47 |
| 3.5.1 | Validace..... | 47 |
| 3.5.2 | Validované parametry..... | 47 |
| 3.5.2.1 | Opakovatelnost..... | 47 |
| 3.5.2.2 | Linearita..... | 48 |
| 3.5.2.3 | Mez detekce..... | 48 |
| 3.5.2.4 | Mez stanovitelnosti..... | 49 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 50 |
| 4.1 | Optimalizace pracovních podmínek v plynové chromatografii..... | 50 |
| 4.2 | Ověření metrologických charakteristik metody..... | 51 |
| 4.2.1 | Standard č. 1..... | 51 |
| 4.2.1.1 | Opakovatelnost..... | 51 |
| 4.2.1.2 | Linearita..... | 51 |
| 4.2.1.3 | Mez detekce a mez stanovitelnosti..... | 52 |
| 4.2.2 | Standard č. 2..... | 53 |
| 4.2.2.1 | Opakovatelnost..... | 54 |
| 4.2.2.2 | Linearita..... | 54 |
| 4.2.2.3 | Mez detekce a mez stanovitelnosti..... | 55 |
| 4.2.3 | Vzorek CLA..... | 56 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 58 |
| 6 | LITERATURA..... | 59 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 63 |
| 8 | PŘÍLOHY..... | 64 |

1 ÚVOD

Náš současný životní styl představuje velké riziko pro zdraví. Stres, nesprávná výživa, nedostatek pohybu vedou ke zvyšování rizika civilizačních chorob, a to zejména kardio-vaskulárních onemocnění, rakoviny, cukrovky a obezity. Vzhledem k vyjmenovaným problémům se zdá být konjugovaná kyselina linolová (CLA) vhodným prostředkem k jejich řešení [1].

Důvodem jsou její fyziologické účinky, které by mohly být prospěšné lidskému zdraví [2]. Když Američan Dr. M.W.Pariza objevil CLA v r. 1987 v hovězím mase, zajímal ho hlavně její účinek na zhoubné nádory, protože o příbuzné kyselině linolové bylo známo, že působí jako karcinogen. Ke studiu si vybral hovězí maso obsažené v hamburgerech, aby studoval, jaké karcinogenní látky lze v této potravíně očekávat. Zjistil, že posunutí dvojných vazeb k sobě uvnitř molekuly CLA znamená úplně opačný účinek než u linolové kyseliny. U CLA z hamburgerů byla tedy naopak prokázána antikarcinogenita.

Kromě ní dokázal Pariza, že CLA ještě působí proti ateroskleróze a patří mezi silné antioxidanty. Potom už nebylo složité doložit, že CLA zamezuje oxidaci LDL-cholesterolu (lipoproteiny nízké hustoty) na nerozpustnou formu, zlepšuje poměr mezi užitečným HDL- (lipoproteiny vysoké hustoty) a škodlivým LDL-cholesterolem a celkově snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Někoho může překvapit, že látka, která se výhradně vyskytuje v živočišných tucích stejně tak jako cholesterol, nás zároveň může chránit proti škodlivým účinkům cholesterolu.

Není divu, že povzbudivé výsledky vědeckého výzkumu CLA rozšířily zájem o tuto látku i v dalších vědeckých kruzích. Dnes se zdá, že CLA může u diabetu 2. typu prokázat podobnou službu jako trojmocný chrom, tj. stabilizovat hladinu krevního cukru. Nadějně také vypadají studie antitrombotických a imunitu zvyšujících účinků CLA [3].

Vzrůstající množství literatury o CLA naznačuje, že tyto izomerické konjugované mastné kyseliny mají významné biochemické a fyziologické účinky, které by mohly přinést prospěch lidskému zdraví a ochránit je proti chronickým chorobám [4]. Proto je CLA předmětem značného zájmu výzkumných pracovišť i laické veřejnosti [2].

Cílem diplomové práce je zpracovat literární přehled o vzniku a výskytu CLA v živočišných materiálech, biologických účincích v lidském organismu a metodách vhodných pro stanovení CLA. Dále vypracování a validace metody vhodné pro stanovení CLA ve vybraných biologických matricích pomocí plynové chromatografie. Na závěr zhodnotit výhody této metody a její použitelnost.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou nejdůležitější a z hlediska výživy nejvýznamnější složkou lipidů. Podle názvosloví užívaného v organické chemii se jako mastné kyseliny označují karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem, ale tato definice se úplně nekryje s mastnými kyselinami přítomnými v lipidech. Některé mastné kyseliny podle definice užívané organickými chemiky (např. octová kyselina) nejsou přítomny v přírodních lipidech i když se mohou vyskytovat v průmyslových tukových výrobcích. Naopak některé mastné kyseliny vázané v lipidech jsou alicyklické nebo dokonce aromatické sloučeniny.

2.1.1 Struktura a názvosloví

V přírodě a tedy také v potravinách se vyskytují v lipidech tyto skupiny mastných kyselin:

- nasycené mastné kyseliny
- nenasyčené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové)
- nenasyčené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenové)
- mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty (rozvětvené, cyklické, s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými funkčními skupinami).

V odborné literatuře se pro stručnost uvádějí schematické zkratky MK ve formě C N:M, kde N je počet atomů uhlíku v molekule a M počet dvojných vazeb; tak např. C 18:2 znamená mastné kyseliny s 18 atomy uhlíku a 2 dvojnými vazbami (oktadekadienové). Pokud si přejeme uvést polohy dvojných vazeb, často se v literatuře udává symbol $\Delta^{a,b,c,d}$, kde písmena udávají polohy dvojných vazeb, např. $\Delta^{9,12}$ znamená, že dvojně vazby jsou na 9. a 12. atomu uhlíku od karboxylu. Tak je tomu například u linolové kyseliny [5].

2.1.1.1 Nasycené kyseliny

Nasycené mastné kyseliny jsou běžnou složkou přírodních lipidů. Nechemici jim někdy podle angličtiny říkají satureované. Obsahují 4 až asi 60 atomů uhlíku a zpravidla rovný, nerozvětvený řetězec, nejčastěji o sudém počtu atomů uhlíku. Přehled důležitějších mastných kyselin se sudým počtem atomů uhlíku v molekule je uveden v *tabulce 2.1*. Vedle systematických názvů se užívají také triviální názvy, které zvláště u obvyklých mastných kyselin v běžné praxi převládají.

Tabulka 2.1: Hlavní nasycené mastné kyseliny vyskytující se v lipidech

| <i>Mastná kyselina</i> | <i>Počet atomů uhlíku</i> | <i>Triviální název</i> |
|------------------------|---------------------------|------------------------|
| butanová | 4 | máselná |
| hexanová | 6 | kapronová |
| oktanová | 8 | kaprylová |
| dekanová | 10 | kaprinová |
| dodekanová | 12 | laurová |
| tetradekanová | 14 | myristová |
| hexadekanová | 16 | palmitová |
| oktadekanová | 18 | stearová |
| eikosanová | 20 | arachová |

| | | |
|-----------------|----|-------------|
| dokosanová | 22 | behenová |
| tetrakosanová | 24 | lignocerová |
| hexakosanová | 26 | cerotová |
| oktakosanová | 28 | montanová |
| triakontanová | 30 | melissová |
| dotriakontanová | 32 | lakcerová |

2.1.1.2 Nenasycené kyseliny s jednou dvojnou vazbou

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (nazývají se stručněji monoenové) se liší navzájem podle počtu atomů uhlíku, polohy dvojně vazby a její prostorové konfigurace. Nejvýznamnější z nich jsou uvedeny v *tabulce 2.2*. Mnohé nenasycené monoenové mastné kyseliny mají své triviální názvy, které jsou běžně používány. Typickým příkladem je olejová kyselina.

Prostorová konfigurace bývá u přirozených sloučenin zpravidla *cis* neboli *Z*, mnohem řidčeji *trans* neboli *E*. V systematických názvech se již užívá novější označení *Z* a *E*, ale daleko běžnější (a stále správné) je označení *cis* nebo *trans* [5].

Tabulka 2.2: Hlavní monoenové mastné kyseliny vyskytující se v lipidech

| Mastná kyselina | Počet atomů uhlíku | Poloha dvojně vazby | Izomer | Triviální název |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------|------------------------------|
| decenová | 10 | 4 | <i>cis</i> | obtusilová |
| decenová | 10 | 9 | <i>cis</i> | kaprolejová |
| dodecenová | 12 | 3 | <i>cis</i> | linderová |
| dodecenová | 12 | 9 | <i>cis</i> | laurolejová |
| tetradecenová | 14 | 4 | <i>cis</i> | tsuzuová |
| tetradecenová | 14 | 9 | <i>cis</i> | myristolejová |
| hexadecenová | 16 | 9 | <i>cis</i> | palmitolejová |
| hexadecenová | 16 | 9 | <i>trans</i> | palmitelaidová |
| oktadecenová | 18 | 6 | <i>cis</i> | petroselová |
| oktadecenová | 18 | 6 | <i>trans</i> | petroselaidová |
| oktadecenová | 18 | 9 | <i>cis</i> | olejová |
| oktadecenová | 18 | 9 | <i>trans</i> | elaidová |
| oktadecenová | 18 | 11 | <i>trans</i> | vakcenová |
| eikosenová ^{a)} | 20 | 9 | <i>cis</i> | gadolejová |
| eikosenová ^{a)} | 20 | 11 | <i>cis</i> | gondová |
| dokosenová | 22 | 11 | <i>cis</i> | cetolejová |
| dokosenová | 22 | 13 | <i>cis</i> | eruková |
| dokosenová | 22 | 13 | <i>trans</i> | brassidová |
| tetrakosenová | 24 | 15 | <i>cis</i> | selacholejová (nervonová) |
| hexakosenová | 26 | 17 | <i>cis</i> | ximenová |
| triakontenová | 30 | 21 | <i>cis</i> | limekvová |

^{a)} Podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) byl navržen termín ikosenová kyselina, který se však nevžil.

2.1.1.3 Kyseliny s dvěma a více dvojnými vazbami

Mastné kyseliny s dvěma dvojnými vazbami (dienové) jsou velmi důležité ve výživě. Ačkoli teoreticky by jich mohlo být daleko více než monoenových mastných kyselin, v přírodních lipidech se jich vyskytuje v podstatném množství jen několik, které uvádí *tabulka 2.3*. Nejvýznamnější z nich je linolová kyselina.

Tabulka 2.3: Dienové, trienové a další polyenové mastné kyseliny vyskytující se v lipidech

| Mastná kyselina | Počet atomů uhlíku | Poloha dvojných vazeb | Konfigurace dvojných vazby | Triviální název |
|------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| dienové | | | | |
| hexadekadienová | 16 | 9,12 | <i>cis, cis</i> | |
| oktadekadienová | 18 | 9,12 | <i>cis, cis</i> | linolová |
| oktadekadienová | 18 | 12,15 | <i>cis, cis</i> | |
| oktadekadienová | 18 | 9,12 | <i>trans, trans</i> | linolelaidová |
| eikosadienová | 20 | 11,14 | <i>cis, cis</i> | |
| dokosadienová | 22 | 13,16 | <i>cis, cis</i> | |
| trienové | | | | |
| hexadekatrienová | 16 | 6,10,14 | <i>all-cis</i> | hiragonová |
| oktadekatrienová | 18 | 9,12,15 | <i>all-cis</i> | α -linolenová |
| oktadekatrienová | 18 | 6,9,12 | <i>all-cis</i> | γ -linolenová |
| oktadekatrienová | 18 | 9,11,13 | <i>cis, trans, trans</i> | α -eleostearová |
| oktadekatrienová | 18 | 9,11,13 | <i>trans, trans, trans</i> | β -eleostearová |
| oktadekatrienová | 18 | 9,11,13 | <i>cis, cis, trans</i> | puniková |
| eikosatrienová | 20 | 8,11,14 | <i>all-cis</i> | dihomo- γ -linolenová |
| tetraenové | | | | |
| oktadekatetraenová | 18 | 4,8,12,15 | <i>all-cis</i> | moroktová |
| oktadekatetraenová | 18 | 9,11,13,15 | <i>all-trans</i> | β -parinarová |
| eikosatetraenová | 20 | 5,8,11,14 | <i>all-cis</i> | arachidonová |
| eikosatetraenová | 20 | 8,11,14,17 | <i>all-cis</i> | |
| dokosatetraenová | 22 | 7,10,13,16 | <i>all-cis</i> | adrenová |
| pentaenové | | | | |
| eikosapentaenová | 20 | 5,8,11,14,17 | <i>all-cis</i> | EPA |
| eikosapentaenová | 20 | 4,8,12,15,18 | <i>all-cis</i> | timnodonová |
| dokosapentaenová | 22 | 4,7,10,13,16 | <i>all-cis</i> | |
| dokosapentaenová | 22 | 7,10,13,16,19 | <i>all-cis</i> | klupanodonová |
| hexaenové | | | | |
| dokosahexaenová | 22 | 4,7,10,13,16,19 | <i>all-cis</i> | DHA |
| tetrakosahexaenová | 24 | 4,8,12,15,18,21 | <i>all-cis</i> | nisinová |

Zvláštní význam mají mastné kyseliny s konjugovanými dvojnými vazbami, které se svou reaktivitou podstatně liší od mastných kyselin s izolovanými dvojnými vazbami a mají také odlišné fyziologické účinky [5].

Také počet přirozeně se vyskytujících mastných kyselin s třemi dvojnými vazbami je značně menší než by odpovídalo možnostem izomerie (*tabulka 2.3*). Nejvýznamnější je linolenová kyselina, v biologických textech často označovaná jako α -linolenová kyselina (9,12,15-oktadekatrienová kyselina, řada n-3), na rozdíl od izomerní γ -linolenové kyseliny (6,9,12-oktadekatrienové kyseliny, řada n-6), která má odlišnou fyziologickou účinnost.

Poměrně vzácně se vyskytují také mastné kyseliny se čtyřmi až šesti dvojnými vazbami v molekule (*tabulka 2.3*). K nejvýznamnějším z nich patří mastné kyseliny se 4 a 5 dvojnými vazbami.

2.1.1.4 Alkinové, rozvětvené a cyklické kyseliny

Ve srovnání s výše uvedenými typy mastných kyselin jsou tyto kyseliny v potravinářství a ve výživě podstatně méně důležité. Patří sem například arachidonová kyselina.

2.1.1.5 Kyseliny s další kyslíkatou funkční skupinou

Hydroxykyseliny se v přírodě vyskytují v poměrně velkém počtu, avšak většinou jen jako méně významné mastné kyseliny. Z nenasyčených hydroxykyselin je nejznámější ricinolejová kyselina řady D-(+). Je provázena 9,10-dihydroxystearovou a 9,10,12-trihydroxystearovou kyselinou, které se vyskytují také v některých jedlých tucích jako sekundární produkty oxidace.

Z polyhydroxykyselin mají význam sativové neboli 9,10,12,13-tetrahydroxyoktadekanové kyseliny odvozené od linolové kyseliny (existuje několik stérických izomerů). Obdobně vznikají oxidací linolenové kyseliny 9,10,12,13,15,16-hexahydroxyoktadekanové neboli linusové kyseliny. Přehled hydroxymastných kyselin je v *tabulce 2.4*.

Tabulka 2.4: Některé významnější hydroxykyseliny, oxokyseliny a epoxykyseliny vyskytující se v lipidech

| <i>Mastná kyselina</i> | <i>Počet atomů uhlíku</i> | <i>Poloha dvojných vazeb</i> | <i>Poloha funkčních skupin</i> | <i>Triviální název</i> |
|--------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| hydroxykyselina | | | | |
| hydroxytetradekanová | 14 | | 14 | |
| hydroxyoktadekanová | 18 | | 2 | |
| hydroxyeikosanová | 20 | | 2 | |
| hydroxydokosanová | 22 | | 2 | fellonová |
| hydroxytetrakosanová | 24 | | 2 | hydroxynervonová |
| hydroxyhexadecenová | 16 | 7 | 16 | ambrettolová |
| hydroxyoktadecenová | 18 | 9 | 12 | ricinolejová |
| hydroxytetrakosenová | 24 | 15 | 2 | cerebronová |
| hydroxyoktadekadienová | 18 | 10,12 | 9 | dimorfekolová |
| hydroxyoktadekatrienová | 18 | 9,12,13 | 2 | kemolenová |
| hydroxyoktadekatrienová | 18 | 9,11,15 | 18 | hydroxylinolenová |
| dihydroxyoktadekanová | 18 | | 9,10 | dihydroxystearová |
| dihydroxytriakontanová | 30 | | 9,10 | lanocerová |
| tetrahydroxyoktadekanová | 18 | | 9,10,12,13 | sativová |
| hexahydroxyoktadekanová | 18 | | 9,10,12,13,15,16 | linusová |

| | | | | |
|-----------------------|----|------------|-------|---------------|
| oxokyselina | | | | |
| oxooktadekatrienová | 18 | 9,11,13 | 4 | likanová |
| oxooktadekatetraenová | 18 | 9,11,13,15 | 4 | parinarová |
| epoxykyselina | | | | |
| epoxyoktadecenová | 18 | 9 | 12,13 | vernolová |
| epoxyoktadecenová | 18 | 12 | 9,10 | koronarová |
| epoxyoktadekadienová | 18 | 9,12 | 15,16 | epoxylinolová |

2.1.1.6 Jiné kyseliny

Existují také mastné kyseliny obsahující síru vázanou v uhlovodíkovém řetězci nebo dusík, např. v kyanové skupině [5].

2.1.2 Metabolismus mastných kyselin

Ve stravě přijímá člověk jen málo volných mastných kyselin. Ostatní lipidy konzumované ve stravě se v malé míře již v žaludku, ale převážně teprve v tenkém střevě enzymově štěpí na mastné kyseliny a nejčastěji teprve jako takové se vstřebávají střevní stěnou. Kromě mastných kyselin přijímaných ve stravě je člověk schopen také nasycené a nenasycené mastné kyseliny syntetizovat podobně jako jiní živočichové a rostliny.

Na rozdíl od rostlin nedovede člověk syntetizovat polyenové mastné kyseliny řady n-3 a n-6, ačkoli je nezbytně potřebuje k životu. Musí tyto mastné kyseliny (tzv. esenciální mastné kyseliny) nebo jejich prekuzory v dostatečném množství přijímat ve stravě [5].

2.1.2.1 Syntéza v lidském těle

Nasycené mastné kyseliny se syntetizují z acetyl-CoA. Při každém cyklu se prodlouží řetězec mastné kyseliny vždy o dva atomy uhlíku, proto se mastné kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku vyskytují v lipidech daleko častěji než mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku. Syntéza se většinou zastaví po dosažení 16-18 atomů uhlíku. U některých organismů, hlavně těch, které produkují vosky, postupuje syntéza v určitých případech dále. Syntéza se uskutečňuje v cytoplasmě pomocí komplexu zvaného synthasa mastných kyselin, ve kterém se vyskytuje specifický SH protein ACP (*Acyl-Carrier Protein* – koenzym synthetas MK) obsahující vázanou pantothenovou kyselinu [5, 6].

V první reakci se acetyl-CoA mění na acetyl-ACP, část acetyl-CoA se karboxyluje na malonyl-CoA a reakcí s ACP vzniká malonyl-ACP. Kondenzací acetyl-ACP s malonyl-ACP a dekarboxylací vzniká acetoacetyl-ACP, redukcí β -hydroxybutyryl-ACP, dehydratací (*E*)-2-butenyl-ACP a další redukcí vzniká butyryl-ACP. Reakcí butyryl-ACP s další molekulou malonyl-ACP se acyl postupně prodlužuje až na 16 uhlíků a vzniká palmityl-ACP.

Palmityl-ACP může reagovat s malonyl-ACP, přičemž vzniká stearyl-ACP. Z obou acyl-ACP se mohou uvolnit příslušné mastné kyseliny (palmitová a stearová) nebo mohou reakcí s CoA vznikat příslušné acyl-CoA, které se uplatní při biosyntéze lipidů (reakce acyl-CoA s fosfátem glycerolu). Stearyl-ACP je dále výchozí látkou pro biosyntézu nenasycených mastných kyselin, tj. olejové, linolové a linolenové. Linolovou a linoleovou kyselinu však není lidský organismus schopen syntetizovat [5].

2.1.2.2 Výživa a metabolismus esenciálních mastných kyselin

Důležitá pro metabolismus je syntéza vyšších esenciálních mastných kyselin. V potravě se přijímají hlavně jejich prekurzory, totiž linolová a α -linolenová kyselina, které lidský organismus není schopen syntetizovat. V lidském organismu se tyto kyseliny prodlouží o 2-4 atomy uhlíku (tzv. elongace) a vytvářejí se další dvojné vazby (tzv. denaturace), takže vznikají mastné kyseliny s 20-22 atomy uhlíku a se 4-6 dvojnými vazbami v molekule. U člověka je nejdůležitější sloučeninou arachidonová kyselina, která se ukládá v biologických membránách jako C-2 ester fosfatidylinositolu aj. fosfolipidů.

Esenciální mastné kyseliny mají v organismu nezastupitelnou úlohu jako prekurzory řady biologicky aktivních látek nazývaných souborně eikosanoidy a dále jako modulační složky biologických membrán, neboť ovlivňují jejich fluiditu a flexibilitu [5]. Největší množství esenciálních mastných kyselin (hlavně kyseliny linolové) se spotřebuje na tvorbu buněčných a intracelulárních membrán, včetně membrán pokožky.

Dále mají velký význam při rozmnožování, výstavbě nervových tkání a asi 1 % slouží k syntéze eikosanoidů. Esenciální mastné kyseliny také zvyšují polaritu a tím i rozpustnost lipoproteinů krevní plasmy. Nedostatek esenciálních mastných kyselin se projevuje na pokožce (zvýšení propustnosti pro vodu, tvorba ekzémů a šupinatá kůže), dále v poruchách rozmnožování, ve větší náchylnosti k infekcím, ve snadnější srážlivosti plasmatických lipoproteinů a v poruchách souvisejících s nedostatečnou tvorbou eikosanoidů [7].

Enzymy provádějící desaturaci a elongaci n-6 a n-3 mastných kyselin jsou stejné, snadněji však probíhá desaturace a elongace u n-3 mastných kyselin. Někteří lidé mají málo aktivní Δ^6 -desaturasu, takže jsou pro ně tyto přeměny znesnadněny. Hlavními faktory, které aktivitu Δ^6 -desaturasy negativně ovlivňují jsou věk (u starších jedinců je aktivita enzymu nižší), výživa (inhibiční účinek na enzym má příjem ethanolu, negativní vliv má deficienze vitamínu B₆, biotinu, Zn, Mg a Ca, vyšší příjem *trans*-nenasycených mastných kyselin a polohových izomerů přirozených nenasyčených kyselin potravou), stres a virové infekce. Dostupné jsou proto přípravky s γ -linolenovou a 8,11,14-eikosatrienovou kyselinou [5].

2.1.2.3 Odbourávání v organismu

V lidském organismu se mastné kyseliny odbourávají nejčastěji mechanismem nazývaným β -oxidace, kdy se z molekuly postupně odštěpuje acetyl-CoA a řetězec se zkrátí o dva atomy uhlíku. Štěpení nenasyčených mastných kyselin probíhá podle obdobných mechanismů. Méně běžná je tzv. α -oxidace, kdy se odštěpuje karboxyl a řetězec se zkrátí o jeden atom uhlíku, přičemž vznikají mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku. Popsána je také ω -oxidace, kdy se nejprve oxiduje methylová skupina na konci řetězce a tvoří se dikarboxylové kyseliny.

Některé mastné kyseliny, jako např. mastné kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem, vysokým bodem tání, *trans*-nenasycené mastné kyseliny a hydroxykyseliny se odbourávají nesnadno a představují určitou zátěž pro organismus pokud jsou ve stravě přítomny ve větším množství [5].

2.1.3 Výskyt

Volné mastné kyseliny vzniklé hydrolýzou lipidů za katalytického působení hydrolas se vyskytují v rostlinných a živočišných organismech jen v malém množství. Většinou jsou vázány jako estery nebo amidy v homolipidech a heterolipidech.

Některé mastné kyseliny, jako např. palmitová nebo olejová, jsou běžné v lipidech všech přírodních materiálů a tedy i v potravinách. Jiné mastné kyseliny jsou specifické jen pro mikroorganismy, rostliny nebo živočichy a jen pro určité rody, čeledi nebo řády. Mají proto význam v taxonomii. Pro jednoduchost je výskyt mastných kyselin volných i vázaných v lipidech popisován dále společně [5].

2.1.3.1 Nasycené kyseliny

Nejběžnější nasycenou kyselinou je kyselina palmitová, která se vyskytuje prakticky ve všech živočišných a rostlinných lipidech, a to v triacylglycerolech i fosfolipidech. Typický je vysoký obsah nasycených kyselin (nejvíce je palmitové a stearové kyseliny) v tuku užitkových zvířat, hlavně vepřů a přežvýkavců. V depotním tuku užitkových ptáků je obsah nasycených mastných kyselin nižší.

Pro mléčné tuky jsou typické nasycené mastné kyseliny s kratším řetězcem, např. máselná kyselina a skupina kyselin s 6-10 uhlíky v molekule. Tuky palmových semen mají vysoký obsah laurové kyseliny, kterou doprovází myristová kyselina a kyseliny s 6-10 uhlíky. U tuku kokosového obsahují volné mastné kyseliny méně nasycených mastných kyselin než vázané mastné kyseliny. Tuk z oplodí palmy olejné (tzv. palmový olej) má zcela jiné složení než tuk ze semen (tzv. palmojádrový olej). Na trhu jsou i jeho frakce (palmolein a palmstearin), které se často přidávají do potravinářských výrobků.

Arachová kyselina a vyšší kyseliny (negenová, lignocerová aj.) jsou přítomny zpravidla ve stopách a jen v některých olejích v relativně vyšším množství. Např. v podzemnicovém oleji bývá 5-7 % kyselin s 20-24 atomy uhlíku, z čehož arachová kyselina představuje asi třetinu. Zhruba 2 % behenové kyseliny se nachází v řepkovém oleji. Ve větším množství se vyšší mastné kyseliny vyskytují ve voscích.

Nasycené mastné kyseliny s lichým počtem uhlíkových atomů jsou poměrně vzácné a vyskytují se jen jako stopové složky. Ve větším množství (hlavně kyselina pentadekanová a heptadekanová neboli margarová, ale stále jen do 1 %) jsou přítomny jen v lipidech některých mikroorganismů, v kožních lipidech a v depotním i mléčném tuku přežvýkavců. Do depotního lidského tuku se dostanou ze stravy [5].

2.1.3.2 Nenasycené kyseliny

Obsah nenasycených mastných kyselin v přírodních lipidových materiálech, např. v tucích a olejích, se pohybuje ve velmi širokém rozmezí, od více než 90 % všech mastných kyselin (např. v řepkovém oleji) po méně než 10 % (např. v kokosovém tuku). Obsah nenasycených mastných kyselin v tucích živočichů se pohybuje v daleko menším rozmezí, mezi 50-70 % (tabulka 2.5).

Jedinou výjimkou jsou rybí oleje, protože obsahují mastné kyseliny s 20-22 atomy uhlíku a se 4-6 dvojnými vazbami. Tuk sladkovodních ryb se liší složením mastných kyselin od tuku mořských ryb. Ryby tyto tuky samy nesyntetizují, ale přijímají je s potravou (jsou přítomny v planktonu, např. v korýších a řasách).

Proto i vodní savci, např. velryby, které se živí drobnými korýši, mají tuk o podobném složení mastných kyselin jako ryby. V rostlinách je ve srovnání se živočichy daleko větší pestrost ve složení nenasycených mastných kyselin.

Tabulka 2.5: Obsah nasycených, monoenových a polyenových mastných kyselin v některých tucích a olejích [% veškerých mastných kyselin]

| Druh tuku | Kyseliny | | |
|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | <i>nasycené</i> | <i>monoenové</i> | <i>polyenové</i> |
| vepřové sádlo | 25- 70 | 37-68 | 4-18 |
| hovězí lůj | 47-86 | 40-60 | 1-5 |
| kuřecí sádlo | 27-30 | 42-47 | 20-24 |
| mléčný tuk | 53-72 | 26-42 | 2-6 |
| tuk kapra | 22-25 | 46-50 | 23-28 |
| tresčí jaterní tuk | 14-25 | 35-68 | 20-45 |
| tuk sledě | 17-29 | 36-77 | 10-24 |
| kokosový tuk | 88-94 | 5-9 | 1-2 |
| palmojádrový tuk | 75-86 | 12-20 | 2-4 |
| palmový tuk | 44-56 | 36-42 | 9-13 |
| kakaové máslo | 58-65 | 33-36 | 2-4 |
| olivový olej | 8-26 | 54-87 | 4-22 |
| rýžový olej | 19-35 | 42-50 | 16-37 |
| bavlníkový olej | 24-33 | 15-23 | 46-59 |
| podzemnicový olej | 14-28 | 40-68 | 15-45 |
| sójový olej | 14-20 | 18-26 | 55-68 |
| slunečnicový olej | 9-17 | 13-41 | 42-74 |
| sezamový olej | 13-18 | 36-44 | 42-48 |
| světlicový olej | 7-13 | 8-23 | 68-84 |
| klíčkový olej | 12-24 | 24-42 | 40-62 |
| řepkový olej | 5-10 | 52-76 | 22-40 |
| lněný olej | 10-12 | 18-22 | 66-72 |

Nejběžnější nenасыcenou mastnou kyselinou je olejová kyselina, která se alespoň v malém množství vyskytuje prakticky ve všech živočišných i rostlinných lipidech. Z polyenových mastných kyselin je nejběžnější linolová kyselina [5]. Značné množství kyseliny linolové je například v sójových bobech, semenech řepky olejné, lněných semínkách, pšeničných klíčcích, konopném semenu, a perilla oleji [8].

Přírodní nenасыcené mastné kyseliny mají většinou konfiguraci *cis* (Z). Kyseliny s konfigurací *trans* (E) se vyskytují hlavně v depotním tuku přežvýkavců, kam se dostávají z potravy přeměněné mikroorganismy v bachoru, kde vznikají při hydrogenaci kyseliny linolenové. Podobně mají zvýšený obsah *trans*-nenасыcených mastných kyselin také jiní savci, v jejichž trávicím systému je tráva a listí předtráveno mikroorganismy (např. klokani).

Tyto *trans*-nenасыcené mastné kyseliny přecházejí částečně také do mléka. S potravou jsou přijímány člověkem, a proto se vyskytují i v lidském depotním tuku. Kyseliny s konfigurací *trans* vznikají také průmyslovou katalytickou hydrogenací nenасыcených mastných kyselin, proto se vyskytují ve značném množství ve ztužených tucích a tukových výrobcích z nich připravených. Tvoří se také při záhřevu tuků obsahujících polyenové mastné kyseliny na teploty přes 240 °C, např. při jejich deodoraci. Také někteří bezobratlí živočichové, ale i rostliny a mikroorganismy, obsahují stopová nebo dokonce větší množství *trans*-kyselin [5].

2.1.4 Vlastnosti

Mastné kyseliny jsou bezbarvé kapaliny nebo tuhé látky. Nižší nasycené mastné kyseliny jsou kapalné, od kyseliny dekanové výše jsou při teplotě místnosti tuhé. Jejich bod tání závisí na počtu atomů uhlíku, ale při jejich počtu vyšším než 20 se již bod tání příliš nemění (tabulka 2.6).

Tabulka 2.6: Body tání některých mastných kyselin a jejich esterů

| <i>Mastná kyselina</i> | <i>Bod tání v °C</i> | <i>Mastná kyselina</i> | <i>Bod tání v °C</i> |
|------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|
| nasycené | | nenasycené | |
| másečná | -7,9 | olejová | 16,0 |
| kapronová | -3,4 | elaidová | 43,7 |
| kaprylová | 16,7 | <i>cis</i> -2-oktadecenová | -6,8 |
| kaprinová | 31,6 | linolová | -5,0 |
| laurová | 44,2 | linolelaidová | 28,0 |
| myristová | 54,1 | linolenová | -10,6 |
| palmitová | 62,7 | eruková | 34,0 |
| stearová | 69,6 | brassidová | 64,6 |
| arachová | 75,4 | arachidonová | -49,5 |
| cerotová | 87,7 | | |

Liché mastné kyseliny mají o něco nižší bod tání než sudé mastné kyseliny o jeden atom uhlíku chudší. Nenasycené mastné kyseliny mají nižší bod tání než nasycené mastné kyseliny. Značný vliv na bod tání, resp. konformaci molekuly, má zejména *cis*-dvojná vazba, neboť způsobí ohyb jinak přímého řetězce o přibližně 42°; *cis*-deriváty mají proto bod tání o několik desítek stupňů nižší než odpovídající *trans*-deriváty [5].

2.2 Konjugovaná kyselina linolová

2.2.1 Struktura a názvosloví

Konjugovaná kyselina linolová je přirozená nenasycená mastná kyselina. Termínem CLA je označována směs pozičních a geometrických izomerů kyseliny linolové (kyselina *cis*-9, *cis*-12 oktadekadienová), které obsahují konjugované, nenasycené dvojné vazby [9]. Zkratka CLA pochází z anglického názvu *Conjugated Linoleic Acid*.

Kyselina linolová má v řetězci 18 atomů uhlíku a dvě dvojné vazby vycházející z atomů uhlíku číslovaných 9 a 12 od karboxylového konce molekuly. To znamená, že kyselina linolová má mezi dvojnými vazbami dvě vazby jednoduché. Prostorové uspořádání na obou dvojných vazbách je *-cis*. U konjugovaných kyselin linolových existují dvě odlišnosti. Dvojně vazby jsou odděleny jen jednou jednoduchou vazbou, což je struktura označovaná v chemii jako konjugovaná. Druhým rozdílem je změna prostorového uspořádání na jedné z dvojných vazeb z původního *cis*- na *trans*-. Tyto odlišnosti v molekule způsobují výrazné změny v biologických účincích na živočichy [10].

Teoreticky by dvojné vazby mohly existovat na jakémkoliv místě od $\Delta 2$ do $\Delta 18$ uhlíků a přinášet tak poměrně velké množství možných izomerických struktur. Izomerické formy oktadekadienové kyseliny mohou obsahovat konjugované dvojné vazby na pozicích 7,9; 8,10; 9,11; 10,12; 11,13; a 12,14 (počítá se od karboxylového konce molekuly) v chemicky připravených směsích CLA nebo přírodních produktech. Každý z výše uvedených pozičních konjugovaných dienových izomerů se může vyskytovat v jedné nebo více následujících čtyř geometrických konfiguracích: *cis*-, *trans*-, *trans*-, *cis*-, *cis*-, *cis*- nebo *trans*-, *trans*-, což by představovalo 24 možných izomerů CLA [4].

V potravinách a potravních doplncích bylo zatím nalezeno 16 izomerů CLA. Existují i mastné kyseliny s konjugovanými dvojnými vazbami a počtem atomů uhlíku větším než 18, např. konjugovaná kyselina arachidonová. V tom případě se ale již nejedná o CLA. Z velkého počtu izomerů CLA můžeme dva považovat za nejvýznamnější. Je to izomer *cis*-9, *trans*-11 a izomer *trans*-10, *cis*-12 [2].

Strukturní vzorec kyseliny linolové (kyselina cis-9, cis-12 oktadekadienová) [2].



Strukturní vzorec konjugované kyseliny linolové (izomer cis-9, trans-11) [2].



Nejběžnější izomer CLA, který se nachází v mase přežvýkavců a mléčných výrobcích z hovězího dobytka je 9-*cis*,11-*trans* (9*c*,11*t*)-CLA. Přítomnost menších komponent jako *t*7,*c*9; *t*8,*c*10; *t*10,*c*12; *t*11,*c*13; *c*11,*t*13 a *t*12,*t*14 izomerů a jejich *cis*,*cis*, *trans*,*trans* izomery byla také nalezena v přírodních produktech. Pro izomer *c*9,*t*11 byla navrhována dvě triviální jména a to kyselina hovězí a kyselina bachorová. Název hovězí kyselina je považována za příliš restriktivní pro CLA, protože izomer *c*9,*t*11 není pouze produktem pocházejícím z bachoru hovězího, ale tím samým mechanismem jej produkují i jiná přežvýkavá zvířata. Jméno bachorová kyselina nyní získává na větší přijatelnosti a objevuje se v literatuře [4].

2.2.2 Výskyt a vlastnosti CLA

CLA je esenciální nenasycená mastná kyselina [11]. Její izomery jsou přítomny v širokém spektru potravin, většinou se však vyskytují pouze ve stopovém množství [8].

Vyšší koncentrace najdeme především v tucích přežvýkavců, tedy v mléčném tuku a loji [10]. Mnohem méně je v masě zvířat s kratší délkou života, tj. v drůbeži a vepřovém masu. Téměř chybí v mořských plodech, rybách a rostlinných tucích [3]. Ve většině potravin představuje izomer *cis*-9, *trans*-11 CLA kolem 90 % ze všech přítomných CLA [10].

To neplatí u rostlinných olejů, které často obsahují několik dalších izomerů [4]. Např. izomer *trans*-10, *cis*-12 vyvíjí největší metabolickou aktivitu pro zlepšování tělesné stavby [12]. Na přeměně „normální“ kyseliny linolové (LA) v tuto konjugovanou kyselinu se podílejí bачorová mikroflóra a enzymy mléčné žlázy [10]. Zajímavé je, že obsah CLA v kravském mléce silně kolísá v průběhu roku a nejvyšší je tehdy, když se krávy v létě volně pasou. Tehdy je obsah CLA v mléce až sedminásobný ve srovnání s mlékem ustájených krav. Proto ti, kteří pijí netučné mléko a jedí nízkotučné mléčné výrobky (např. sýr cottage), CLA v těchto potravinách nenajdou [3].

Tabulka 2.7: Obsah CLA v některých potravinách [3]

| Potravina | Porce | Obsah CLA [mg/porce] |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| Rostlinný olej | 1 lžička (5 g) | 1 |
| Máslo | 1 lžička (7 g) | 76 |
| Tvrdý sýr | 1 plátek (28 g) | 108 |
| Tavený sýr | 1 plátek (28 g) | 169 |
| Pečený hovězí steak | 100 g | 730 |
| Tučný jogurt | 1 kelímek (150 g) | 1050 |

Hlavním zdrojem CLA jsou tedy produkty přežvýkavců - maso i mléko. Kromě toho lze CLA zakoupit jako potravinový doplněk, zpravidla jako přípravek na snížení tělesné hmotnosti. V posledních letech proběhly pokusy s hospodářskými zvířaty, do jejichž krmné dávky byla přidána komerčně dostupná CLA, připravená šetrnou izomerizací kyseliny linolové, získávané například ze slunečnicového oleje. Pokusy prokázaly dobré ukládání CLA v tkáních a výrazné ovlivnění profilu mastných kyselin v jejich lipidové frakci. CLA je tě. možno získat u několika výrobců. Složení této CLA se liší od CLA obsažené v masu a mléce přežvýkavců. Hlavní izomery *cis*-9, *trans*-11 a *trans*-10, *cis*-12 jsou přítomny v podobných množstvích, zatímco u přežvýkavců první z nich výrazně převládá [2]. Schopnost produkovat CLA z kyseliny ricinolejové je velmi rozšířená u mléčných bakterií. Promyté buňky *Lactobacillus plantarum* JCM 1551 byly vybrány jako potenciální katalyzátor k produkci CLA z kyseliny ricinolejové. Buňky kultivované v médiu doplněném směsí kyseliny linolenové a kyseliny linolové vykazovaly zvětšenou produkci CLA.

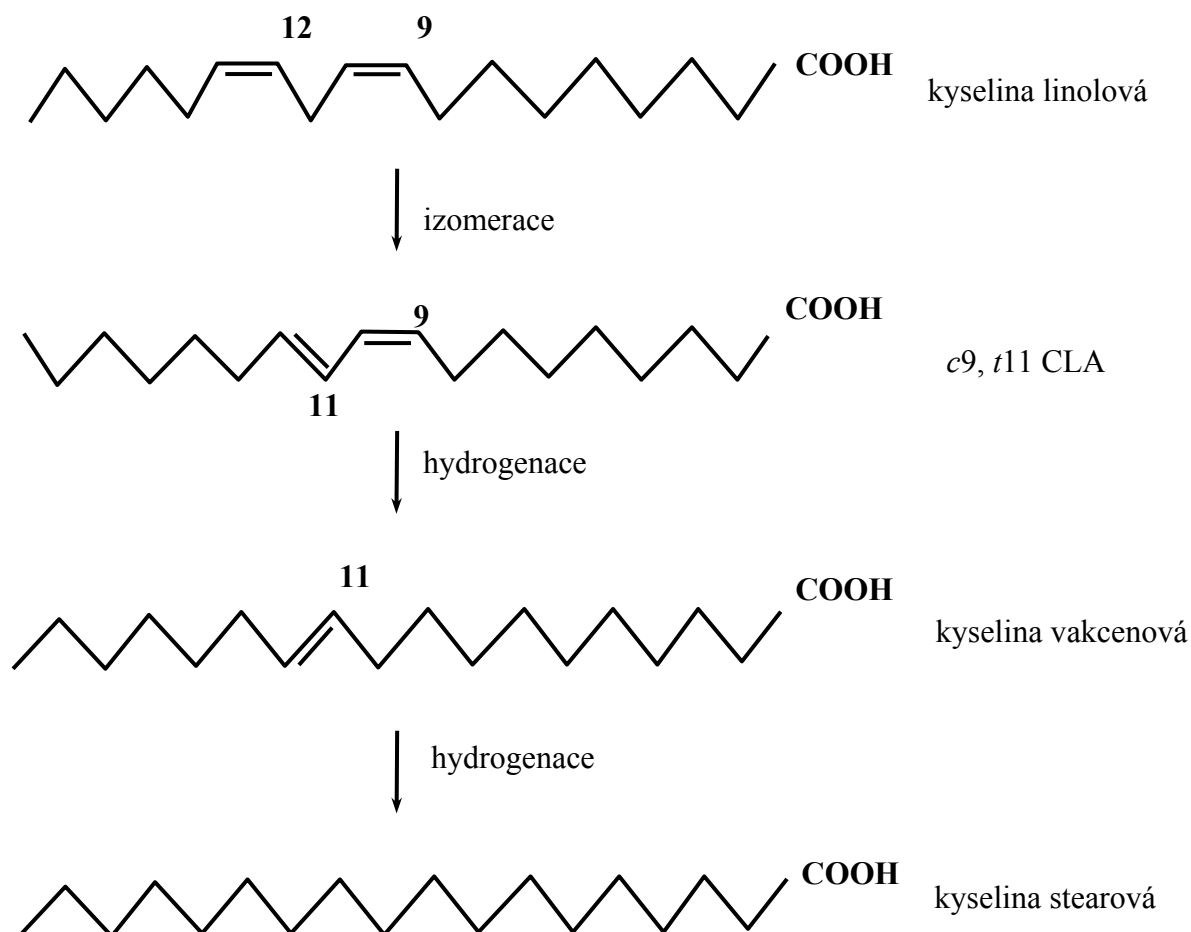
Za optimálních reakčních podmínek, s volnou formou kyseliny ricinolejové jako substrátu a promytých buněk *L. plantarum* jako katalyzátoru, bylo produkováno 2,4 mg/mL CLA z 3,4 mg/mL kyseliny ricinolejové za 90 h, s molárním výtěžkem s ohledem na kyselinu ricinolejovou 71 %. Vyprodukovaná CLA, která byla získána ve formě volných MK, se skládala ze směsi dvou izomerů CLA a to *cis*-9, *trans*-11-oktadekadienové kyseliny (21 % z celkové CLA) a *trans*-9, *trans*-11-oktadekadienové kyseliny (79 % z celkové CLA), a odpovídá 72 % celkového množství získaných MK [13].

2.2.3 Biosyntéza CLA

Nejvýznamnějším zdrojem CLA je metabolismus anaerobních bakterií v předžaludcích přežvýkavců. Růst mnoha anaerobních bakterií je zde inhibován vyššími mastnými kyselinami. Nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami jsou pro bakterie zvláště toxické. Zřejmě proto jsou některé bachorové bakterie schopny nasýtit dvojně vazby mastných kyselin v reakci zvané biohydrogenace.

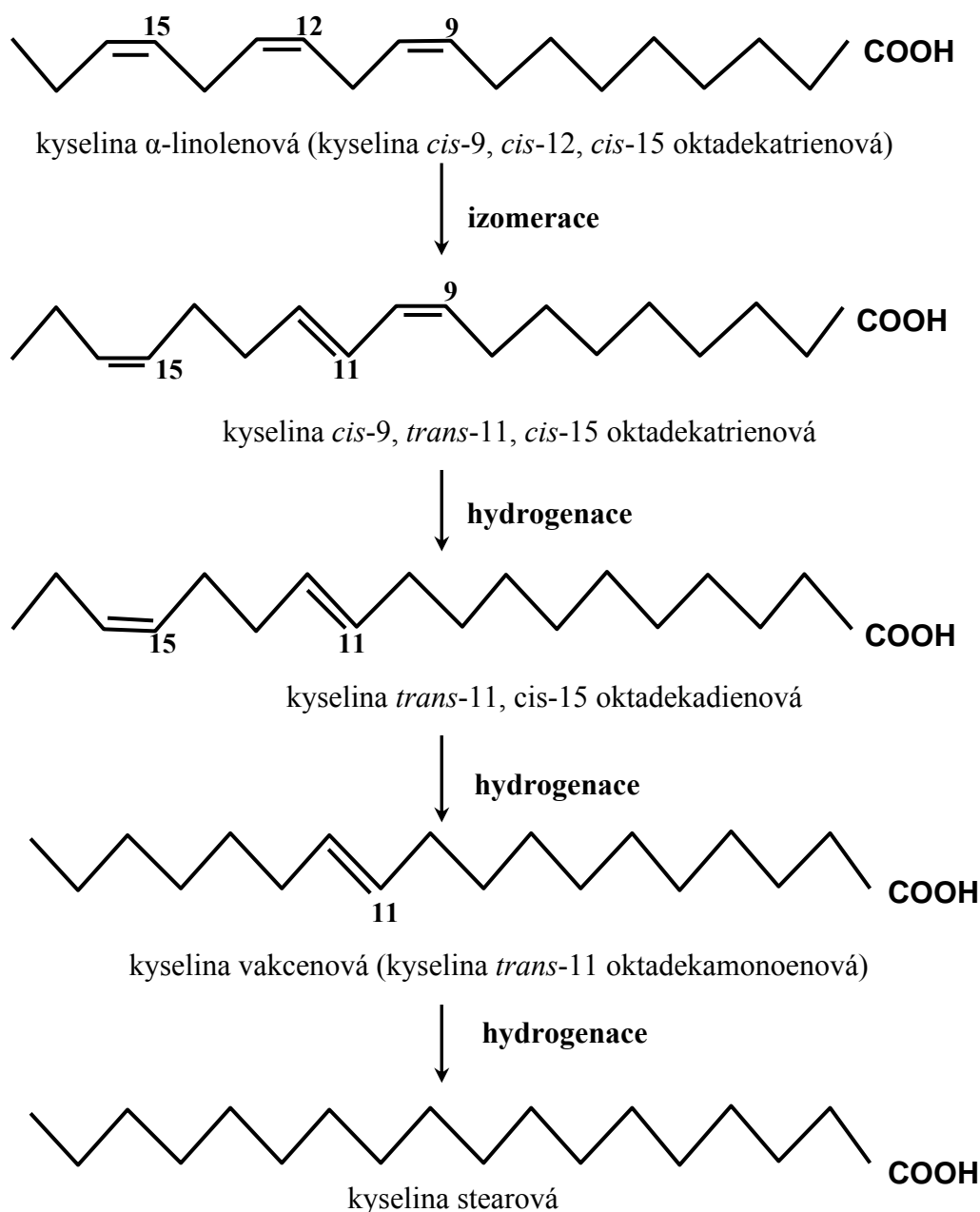
Izomerace a hydrogenace kyseliny linolové byla zjištěna především v kulturách bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*. Bakteriální *cis-trans* oktadekanoát izomerasa vyžaduje pro izomeraci volné COOH skupiny. To znamená, že před izomerací musí být triglyceridy, galaktolipidy a fosfolipidy přítomné v potravě hydrolyzovány lipasami. Konečným produktem reakce je vedle CLA kyselina *trans*-vakcenová (*trans*-11, C_{18:1}), která je rovněž hlavním *trans* izomerem v tkáních přežvýkavců [9]. Hydrogenací vazby *cis* tedy vzniknou *trans*-mononenasycené mastné kyseliny *trans*-11, C_{18:1} (kyselina vakcenová) a *trans*-9, C_{18:1} (kyselina elaidová). Obě tyto kyseliny mohou být v bachoru hydrogenovány až na kyselinu stearovou [2]. Některé bakterie popsané jako *Fusocillus* sp. byly také schopny hydrogenovat linolovou kyselinu až na kyselinu stearovou [9].

Schéma izomerace a hydrogenace kyseliny linolové [2]:



Z nebachorových bakterií byla produkce CLA pozorována u *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus plantarum* a dalších laktobacilů. U střevních bakterií monogastričních zvířat byla produkce CLA rovněž pozorována, ale v daleko menším měřítku [8]. Z bachoru přechází do dalších oddílů trávicího traktu nejen kyselina stearová, ale i mezi-produkty bachorové hydrogenace, tj. CLA a kyselina vakcenová s elaidovou. Kyselina vakcenová je (po vstřebání v tenkém střevu) substrátem pro tkáňovou Δ^9 -desaturasu, která ji mění na *cis*-9, *trans*-11 CLA [2]. U myši bylo zjištěno, že bachorová kyselina může být syntetizována desaturací *trans*-vakcenové kyseliny (*trans*-11, C_{18:1}) a to působením jaterní microsomální desaturasy. Tento mechanismus produkce CLA byl později zjištěn také u přežvýkavců [9].

Kromě bakterií se na hydrogenaci nenasycených MK podílejí i prvoci. Kyselina linolenová je v bachoru hydrogenována obdobným způsobem. Níže je uvedeno reakční schéma převzaté z práce Kellens a kol. [14].

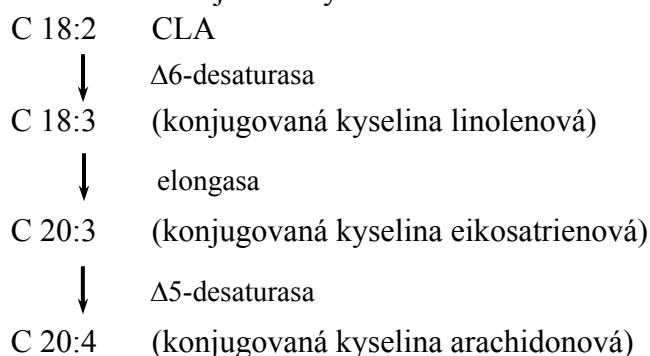


Tvorba CLA tkáňovou $\Delta 9$ -desaturasou je významnější než přísun CLA z bacheru. Lock a Garnsworthy uvádějí, že 80 % CLA mléčného tuku pochází z endogenní syntézy v mléčné žláze. Význam bacheru spočívá v tom, že dodává substrát pro tuto syntézu.

Kyselina vakcenová se může desaturací měnit na CLA i v tkáních jiných živočichů. Nízká dostupnost kyseliny vakcenové však význam tvorby CLA u živočichů s jednoduchým žaludkem omezuje. Tvorba CLA je pouze vedlejší úloha $\Delta 9$ -desaturasy. Ta hlavní spočívá v přeměně kyseliny stearové (konečný produkt bacherové hydrogenace) na kyselinu olejovou [2].

2.2.4 Metabolismus CLA

CLA podléhá stejným reakcím jako jiné polynenasycené MK. Může být oxidována cestou β -oxidace, její řetězec může být prodloužen a také v něm účinkem desaturas mohou vzniknout další dvojné vazby. Takto z CLA vzniká konjugovaná kyselina arachidonová:



V bacheru je CLA hydrogenována na kyselinu vakcenovou, případně až na kyselinu stearovou. V tkáních je CLA inkorporována do triacylglycerolů (TAG) a fosfolipidů. Banni a kol. uvádějí, že CLA je přednostně inkorporována do neutrálních lipidů a méně do fosfolipidů. Naopak kyselina linolová je přednostně inkorporována do fosfolipidů a méně do neutrálních lipidů (triacylglycerolů). Fosfolipidy jsou lipidy buněčných membrán. Důvodem neochoty začlenit CLA do těchto strukturálních lipidů může být okolnost, že *trans*-dvojná vazba v CLA způsobuje neohebnost molekuly, což vede k expansi fosfolipidové dvojvrstvy membrán a narušení jejich funkcí [2].

2.2.5 Fyziologické účinky CLA

Fyziologické účinky CLA byly zjišťovány na různých živočišných modelech, nebo přímo na lidech ve studiích intervenčních případně epidemiologických. K pokusům byla zpravidla použita syntetická CLA, která oba hlavní izomery, tj. *cis*-9, *trans*-11 a *trans*-10, *cis*-12 obsahuje v podobném množství. Nověji je používána CLA izomerově čistá, tj. obsahující jen jeden z obou izomerů. Důvodem je skutečnost, že účinky těchto izomerů se často liší [2].

Ještě nedávno se předpokládalo, že CLA může hrát roli při kontrole obezity, snížení rizika diabetu, a úpravě metabolismu kostí. Vlastnosti CLA zahrnují také antikarcinogenní, arteriosklerotické, antioxidační a imunomodulativní účinky. Navíc, některé studie ukazují, že biologické účinky CLA jsou ovlivněny n-3 MK s dlouhým řetězcem [4].

V posledních letech se však čím dál častěji objevují vědecké studie, které poukazují na statisticky nevýznamné působení CLA na změnu stavby lidského těla a zvažují se podezření o negativním vlivu CLA na vývoj diabetes mellitus. V centru zájmu výzkumníků jsou zjištění, v jaké formě je CLA účinná (volná nebo esterifikovaná) a mechanismus účinku redukce tuků [1].

2.2.5.1 Vliv CLA na hubnutí

Teprve nedávno přinesla věda výklad mechanismu působení CLA při kontrole hmotnosti a podpoře svalového růstu [3]. V řadě studií, uskutečněných zpravidla s laboratorními hlodavci, bylo zjištěno, že CLA má lipodystrofický účinek. Mechanismus, kterým CLA snižuje adipositu, je složitý. CLA zvyšuje aktivitu adrenalinu a noradrenalinu, čímž se urychluje energetický metabolismus a dále CLA ovlivňuje diferenciaci a apoptosu adipocytů [2]. O enzymu lipasa je známo, že přispívá k uvolňování tuku z tukových buněk. CLA tuto lipasu aktivuje, takže jejím účinkem se uvolní více mastných kyselin z tukových zásob do krevního oběhu, který je přenáší do mitochondrií svalových buněk, kde se spalují. Lipoproteinlipasa naopak podporuje transport tělesných mastných kyselin do tukových buněk a CLA její aktivitu inhibuje, takže tuk má menší sklony k ukládání [3].

CLA tedy snižuje zásoby tuku v těle a tento účinek přetrvává i po ukončení jejího podávání. Z obou hlavních izomerů CLA je takto účinný izomer *trans*-10, *cis*-12. Uvedené účinky jsou zřetelné u mladých rostoucích zvířat, ne však u zvířat dospělých [2]. Účinek izomeru *trans*-10, *cis*-12 je zřejmý také ze studie, kde byla kultivována kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* v přítomnosti volné CLA. Jednalo se buď o čistý *trans*-10, *cis*-12 izomer a *cis*-9, *trans*-11 izomer nebo jejich směs v poměru 1:1. Ani čisté izomery ani jejich směs 1:1 neovlivnily růst kvasinky, ale *trans*-10, *cis*-12 izomer snížil množství buněčných lipidů o 40 %. Oba izomery byly včleněny do lipidů kvasinky, jejich množství dosahovalo v TAG až 33 %. S včleněním CLA, kvasinka snížila desaturaci endogenní syntézy MK. Specifické účinky tohoto čistého izomeru CLA na kvasinky by mohly být užitečné k získání více komplexního pohledu na mechanismus účinku CLA na metabolismus lipidů [15].

V literatuře lze nalézt i popis dvou dlouhodobých intervenčních pokusů, oba v trvání 12 měsíců. Týkaly se lidí s nadváhou. V těchto pokusech CLA v množství 3,4 g/den snížila hmotnost tuku, přičemž účinek přetrvával i po ukončení podávání.

V jedné ze studií Bhattacharya a kol. byl zjišťován vliv příjmu 3 g CLA/den po dobu 64 dnů na hmotnost tuku dospělých zdravých žen. V tomto pokuse hmotnost tuku ani oxidace MK nebyly ovlivněny. Obdobně nebyl zjištěn vliv příjmu 2,1 g CLA/den po 45 dnů na složení těla mladých žen se sedavým zaměstnáním [16].

Existují nicméně dvě norské studie, kdy snížení hmotnosti tuku u lidí bylo prokázáno. V jedné z nich dávka až 6,8 g CLA/den po 12 týdnů snížila hmotnost tuku při zachování celkové tělesné hmotnosti. V druhé CLA v dávce 1,8 g/den snížila hmotnost tuku u zdravých cvičících lidí. V jiné studii byla CLA v množství 4,2 g/den podávána po 4 týdny obézním mužům středního věku. Autoři studie došli k závěru, že CLA může snížit abdominální tuk, nikoliv však celkovou obezitu [2]. Bhattacharya a kol. dále uvádějí, že u myši CLA zvyšuje lipolýzu a oxidaci MK za současného snížení ukládání MK do tukové tkáně. Rovněž zde je za tyto účinky odpovědný izomer *trans*-10, *cis*-12 CLA [16].

Jiná studie se prováděla na jednácti obézních jedincích, kteří dodržovali nízkokalorickou dietu a nenáročný cvičební program. Polovina z nich užívala přibližně 3 g CLA denně, zatímco druhá polovina dostávala placebo (neúčinnou látku) se slunečnicovým olejem. Po šesti měsících shodily obě skupiny celkem v průměru dvě a půl kila. Zajímavé bylo, že samotný doplněk výživy s CLA sice přímo nepřispěl k váhovému úbytku, ale jakmile účastníci končili s dietou, zabránil jim nabrat tuk zpátky. Místo tuku přibírali svalovou hmotu, která jim výrazně zpevňovala a tvarovala postavu. Studie dokázala, že CLA je vhodný přípravek pro kontrolu váhy, jednoduše z toho důvodu, že pomáhá lidem, kteří drží dietu, štíhlou postavu udržet, když už jednou dosáhli žádoucí hmotnosti.

Vědci, kteří výše zmíněnou studii prováděli, také zaznamenali, že jednotlivci, kteří užívali doplněk s CLA, vykazovali méně depresí. Zdá se, že u skupiny užívající CLA se méně často vyskytovaly nepříjemné pocity, jež jsou při dietách a hubnutí běžné. Jinak vyjádřeno - CLA jim pomohla v dietě vytrvat a její výsledky udržet.

V dalším pokusu dvě skupiny (po 27 osobách) cvičících užívaly CLA (5600 mg/den) nebo placebo (olivový olej). Ve skupině s CLA se zvýšily silové výkony ve cvičích v průměru o 13,6 kg/měsíc, zatímco ve skupině s placebem pouze o 4,3 kg.

Dvě skupiny (po 24 osobách) začínajících sportovců užívaly buď 7200 mg CLA/den, nebo placebo (rostlinný olej). Po šestitýdenním tréninku dosáhla skupina s CLA pozoruhodných výsledků při budování svalové hmoty a nárůstu síly. Přírůstky celkové svalové hmoty, obvodu bicepsu a nárůst síly byl téměř o 100 % vyšší než u skupiny, která užívala placebo.

Za doporučenou denní dávku pro běžnou populaci, usilující o kontrolu hmotnosti, se považuje 1000 - 2000 mg denně. U sportovců, kteří chtějí ztratit co nejvíce tuku, podpořit svalový růst a výkon se osvědčilo dávkování až 3000 mg/den, které se také doporučuje při obezitě. Některé výzkumy však naznačují, že dlouhodobé užívání CLA může zvyšovat riziko rakoviny jater. V jedné studii byl u myši krmených CLA prokázán zvýšený energetický výdej, snížený příjem potravy a snížené hromadění tuku, ale také snížený obsah bílkovin v těle. Myši krmené CLA měly zvýšenou hmotnost jater, což by mohlo být důsledkem hromadění tuku v játrech. Protože toho mnoho nevíme o vedlejších účincích při dlouhodobém užívání, nedoporučuje se tato látka užívat dlouhodobě [3].

2.2.5.2 CLA a rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění

Od té doby, co je známo, že izomery těchto mastných kyselin vykazují redukci arterogeneze ve zvířecích studiích, zahrnují potenciální zdravotní přínosy CLA také v prevenci kardiovaskulárních nemocí [4].

CLA potlačuje vznik atherosklerotických lezí u pokusných zvířat přijímajících dietu s vysokým obsahem cholesterolu. Základním živočišným modelem pro tyto studie jsou králíci, u nichž lze atherosklerosu snadno vyvolat. Účinek CLA byl potvrzen i v pokusech s křečkami [2]. De Deckere a kol. zjistili, že směs obou izomerů CLA a *l*10, *c*12 CLA, nikoliv však *c*9, *l*11 CLA, snižují LDL- a HDL-cholesterol a zvyšují VLDL-cholesterol (lipoproteiny velmi nízké hustoty) u křečků. To naznačuje, že pouze izomer *l*10, *c*12 CLA je schopen měnit skladbu lipoproteinů v krvi [17].

V kulturách krevních destiček CLA inhibovala jejich agregaci indukovanou arachidonátem nebo kolagenem. To je dáváno do souvislosti se sníženou tvorbou thromboxanů, které podporují agregaci. Thromboxany vznikají z arachidonátu reakcí, kterou katalyzuje cyklooxygenasa. Snížení obsahu lipidů v krvi může souviset i s inhibicí stearoyl-CoA desaturasy, která již byla zmíněna. Expres genu tohoto enzymu je přísně regulována. Oba izomery CLA inhibují jeho aktivitu. Myši, které mají gen stearoyl-CoA desaturasy zablokovan, mají nižší lipémii a cholesterolémii. Rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění je také hypertenze. Inoue a kol. ukázali, že izomer *l*10, *c*12, nikoliv však izomer *c*9, *l*11 snižuje krevní tlak u potkanů náchylných k vývoji obezity, diabetu či hypertenzi.

Účinek CLA na atherosklerosu a rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění byl u lidí studován méně než u zvířat. Závěry různých autorů navíc nejsou shodné [2]. Výčet uskutečněných klinických pokusů podávají Bhattacharya a kol.. Podle jednoho z nich příjem CLA (oba izomery) v množství 3,9 g/den neměl vliv na plasmatické lipidy, podle jiného příjem 4,2 g CLA/den po 12 týdnů neovlivnil lipémii ani skladbu sérových lipoproteinů [16].

Jsou však i výsledky pozitivní. Mougios a kol. zjistili, že podání 0,7 g CLA/den po 4 týdny vedlo ke snížení sérového cholesterolu a triacylglycerolů [2]. Další pokus vedl ke zjištění, že izomer *t*10, *c*12 CLA zvýšil plasmatické triacylglyceroly a poměr LDL- a HDL-cholesterolu, zatímco izomer *c*9, *t*11 CLA tyto ukazatele snížil [18].

V současnosti není žádný důkaz, který by podpořil hypotézu, že CLA chrání před vznikem arterogeneze. Původně se předpokládalo, že je CLA schopná chránit částice LDL před oxidací, nicméně, nedávné *in vitro* vyšetřování van den Bergem a kol. neukázalo žádné antioxidační vlastnosti, které by se daly přičíst CLA. Dále, CLA ukázala svůj pozitivní účinek na arterosklerózu u králíků, ale ne u myši, což by mohlo indikovat rozdílnost druhů pro odezvu příjmu doplňků CLA v potravě [4].

2.2.5.3 CLA a diabetes typu II

Jelikož je tuková tkáň důležitým místem pro regulaci metabolismu glukosy a CLA ukázala, že moduluje zrání a diferenciaci adipocytů a působí na metabolismus lipidů, lze předpokládat, že by mohla ovlivnit metabolismus glukosy při diabetu [4].

Je více rizikových faktorů, které podporují vznik diabetu typu II, např. věk a genetické založení. Hlavním rizikovým faktorem je však obezita. Z výsledků různých pokusů vyplývá, že v krvi potkanů CLA snižuje koncentraci glukosy na lačno, koncentraci insulinu, triacylglycerolů, volných MK a leptinu. Rovněž bylo zjištěno Ryderem a kol., že CLA zvyšuje spotřebu glukosy ve tkáních potkanů. Protože tento účinek nemá izomer *c*9, *t*11 CLA, autoři soudí, že nástup diabetu II může zpomalit jen *t*10, *c*12 CLA. Další pokusy ukázaly, že CLA má různé účinky u diabetických a normoglykemických zvířat. Také, že se liší účinek krátkodobého a dlouhodobého podávání CLA. Podle Wargenta a kol. CLA může zpočátku zhoršit citlivost tkání na insulin, ale při dlouhé době podávání naopak zlepšit [2]. Výsledky klinických studií, tak jak je shrnují Bhattacharya a kol. není jednoduché interpretovat. Záleží nejen na izomerovém složení použité CLA, ale i na stavu osob účastnících se pokusu, zda jsou obézní, zda diabetici či nikoliv, zda podávání CLA bylo krátkodobé či dlouhodobé. Shoda panuje v názoru, že aktivně působí jen *t*10, *c*12 CLA [16].

Belury popisuje pokus s diabetiky II. typu, kteří denně dostávali 6 g CLA či placebo po 8 týdnů. CLA významně snížila glykémii na lačno, koncentraci leptinu v plasmě, index tělesné hmotnosti a nevýznamně také tělesný tuk. Naopak CLA neovlivnila insulin na lačno, triacylglyceroly, cholesterol a HDL. Belury proto hodnotí účinky CLA u diabetiků kladně [19].

2.2.5.4 CLA a karcinogeneze

CLA je známým antioxidantem a antikarcinogenem primárně spojovaným s potravinami, které pochází ze zvířat. Ha a kol. poskytli jedno z prvních pozorování. CLA získaná z hovězího byla ochranou proti chemicky indukované rakovině. V této studii, CLA izolovaná z extraktů grilovaného mletého hovězího snížila kožní nádory u myši ošetřených známým karcinogenem 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracenem (DMBA). Od té doby, velké množství badatelů zaznamenalo potenciální zdravotní a biologické účinky izomerů CLA [4].

Například Ip a kolegové zjistili, že podávání CLA krysám způsobilo podstatné snížení výskytu nádoru. Není zde však žádný přímý důkaz, že by nás tyto mastné kyseliny chránily před karcinogeny. Antikarcinogenní účinky izomerů CLA byly testovány na zvířecích modelech a buněčných kultivacích.

Rozsáhlá práce byla také provedena při určování antikarcinogenních vlastností CLA. Ukázalo se, že izomery CLA redukují chemicky vyvolané nádorové bujení u mléčných žláz a tlustého střeva krys. Navíc, CLA změnila chemicky vyvolaný karcinom u kůže a žaludku myši. Zdroje CLA dále zabránily růstu řetězce lidských nádorových buněk v kultivaci a u SCID (severe combined immunodeficient) myši [4].

CLA a kolorektální karcinom

Kim a kol. zjistili, že proliferaci buněk karcinomu tlustého střeva Caco 2 inhibuje *t10, c12* CLA. Izomer *c9, t11* CLA je bez účinku. Izomer *t10, c12* CLA indukuje apoptosu (programovaný zánik) buněk. V pokuse s potkany 1 % CLA v dietě podávané 30 týdnů zabránilo vývoji karcinomu tlustého střeva, vyvolanému dimethylhydrazinem. Klinické studie sledující vliv CLA na kolorektální karcinogenezi jsou těžko proveditelné [20].

Bhattacharya a kol. však zmiňují studii epidemiologickou, podle které příjem mléčných výrobků bohatých na tuk, potažmo CLA může riziko kolorektálního karcinomu zmírnit. Je však zřejmé, že v tomto případě hrají roli i další látky v mléčných výrobcích obsažené, např. vápník [16].

CLA a karcinom prsu

Z epidemiologických studií vyplývá, že potravní zdroje CLA jsou prospěšné. Spojují spotřebu mléka se snížením rakoviny prsu. V nedávné studii, Knekt a kol. našli podstatný inverzní vztah mezi příjmem mléka a výskytem rakoviny prsu u původně zdravých finských žen. Bylo zjištěno, že riziko rakoviny prsu se o polovinu snížilo u žen, které konzumovaly více než 620 ml mléka/den ve srovnání s těmi, které konzumovaly méně než 370 ml/den a předpokládají, že CLA byla tímto činným komponentem. Průměrný obsah CLA v mléce je kolem 10 mg·g⁻¹ mléčného tuku. Na základě obsahu průměrného tuku 35 g·l⁻¹ mléka, by denní příjem CLA mohl být 217 mg u žen konzumujících 620 ml mléka denně a 130 mg u žen, které konzumovaly 370 ml mléka denně. Nicméně, příjem CLA u těchto žen je stále ještě pod odhadovanou hladinou 1 g/den CLA, což je podle Ip a kol. významné množství pro prevenci rakoviny [4]. V jiné dietní studii používali krysy ošetřené DMBA. Tlumící efekt CLA na vyvolanou rakovinu prsu byl zjištěn jako nezávislý na typu tuku (byly prošetřovány pouze n-6 mastné kyseliny a ne n-3 mastné kyseliny) v dietě [21].

Po podání dávek CLA krysám, se izomery mastné kyseliny včlenily do lipidů prsní žlázy a množství v neutrálních lipidech velmi vzrostlo. Když byla CLA odstraněna z diety, množství neutrálních lipidů a fosfolipidů s CLA se vrátilo po 4 a 8 týdnech do původních hodnot. Autor vyzníval, že snižování obsahu CLA v neutrálních lipidech následuje po odstranění CLA ze stravy a souběžně dochází k výskytu nových nádorů v krysí tkáni. Vypadá to, že akumulace CLA do tkáně je pro svůj protinádorový účinek důležitá [22].

Dobře známa je také souvislost mezi estrogeny a karcinomem prsu. CLA má antiestrogenní účinky, dané tím, že snižuje aktivitu receptorů estrogenů. V pokusech s potkany CLA snížila výskyt chemicky vyvolaného karcinomu mléčné žlázy až o 60 %. Účinek CLA nebyl ovlivněn množstvím a typem současně podaného tuku. CLA rovněž inhibuje angiogenezi ve zvětšujícím se nádoru. Mechanismus inhibice je složitý, ne zcela jasný. Ví se například, že izomer *t10, c12* CLA snižuje aktivitu leptinu, který angiogenezi podporuje. Klinické studie tohoto zaměření lze těžko uskutečnit, proto se alespoň hledala souvislost mezi obsahem CLA v tukové tkáni a výskytem karcinomu prsu, nebyla však nalezena [2].

Další experimenty využívající chemicky připravené směsi CLA ukázaly, že přírodní forma CLA nalezená v mléčných výrobcích je aktivní při redukci výskytu prsních nádorů u krys.

Z výsledků epidemiologických studií můžeme říci, že faktory redukcujícími riziko rakoviny mohou být nejen mléčné tuky, ale také jiný životní styl nebo strava. Např. příjem ryb (n-3 mastných kyselin), které by ovlivnily výskyt rakoviny. Experimenty za účelem výzkumu role CLA u lidské rakoviny jsou potřebné k identifikaci vztahů mezi těmito mastnými kyselinami a jinými faktory životního stylu, které přispívají ke snížení rizika vzniku rakoviny [4].

CLA a karcinom prostaty

Antikarcinogenní účinky CLA na lidské rakovinné buňky prostaty byly zkoumány na zvířecích modelech. Cesano a kol. testovali účinky jak CLA tak LA na lidské prostatické rakovinné buňky u myši, kterým byly naočkovány rakovinné buňky do podkoží. U myši, které dostávaly CLA, se ukázaly nejen menší lokální nádory, ale také velké snížení plicních metastáz. Myši, které dostávaly LA měly větší lokální nádory ve srovnání s těmi, které dostávaly CLA. Z výše uvedených studií je evidentní, že CLA a LA mají rozdílné biologické účinky [4].

Dále jsou známy výsledky pokusů s účinkem CLA v kulturách buněk karcinomu, které naznačují, že izomer *t*10, *c*12 CLA je účinnější při indukci apoptosy. Izomer *c*9, *t*11 CLA má rovněž ochranný účinek vůči karcinomu prostaty, působí ale odlišným způsobem. Zasahuje do metabolismu kyseliny arachidonové, tvorby eikosanoidů tím, že ovlivňuje expresi lipooxygenasy a cyklooxygenasy [2].

2.2.5.5 CLA a funkce imunitního systému

Imunitní systém je velmi složitý a všechny dílčí účinky CLA není jednoduché postihnout. Přehled pokusů na zvířatech podávají Belury a Bhattacharya a kol.. Účinek CLA se prolíná s účinkem ostatních polynenasycených MK, zejména co se týče vlivu na cytokiny (např. interferon- γ), eikosanoidy a oxid dusnatý. Exaktních studií u lidí je málo. Zdá se, že CLA se ve svých účincích na imunitní funkce neliší od kyseliny linolové. Žádné pochybnosti nejsou o tom, že CLA snižuje tvorbu prostaglandinu PGE₂ a oxidu dusnatého [2].

2.2.5.6 Vliv CLA na kosti

Ve studii účinků izomerů CLA na tvorbu kostí u dospívajících krysích samců bylo zjištěno, že jsou rozdílné u různých orgánů a tkání. Mozek vykázal nejnížší koncentraci izomerů, ale kostní tkáň (okostice a morek) obsahovaly nejvyšší množství. CLA stejně jako n-3 mastné kyseliny snížily *ex vivo* produkci prostaglandinu E₂ v kostní orgánové kultuře [4].

V jiné studii byla krysám podávána CLA ve výši 0,5 %. Výsledkem tohoto opatření bylo, že celkové hladiny CLA byly v rozmezí 0,27 do 0,43 % v polární lipidové frakci a 2,02 až 3,37 % v neutrálních lipidech v játrech, kostním morku a okostnici. Zjistilo se, že CLA se akumulovala ve vyšších koncentracích v neutrálních lipidech ve srovnání s polárními lipidy, což bylo konzistentní se zjištěními Ipa a kol. u prsní žlázy krys [21].

2.2.6 CLA v lidské tkáni

CLA byla identifikována v různých lidských tkáních, jako např. tukové tkáni, séru, žluči, mateřském mléku a dvanáctíkových sekretech. Fogerty a kol. zaznamenali 5,8 mg·g⁻¹ tuku CLA v mateřském mléce žen, které dodržovaly normální australskou stravu.

Precht a Molkentin uvádějí hodnotu $3,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku (rozmezí $2,2$ až $6,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku) v mateřském mléce získaném od 40-ti německých žen. McGuire a kol. analyzovali 14 vzorků mateřského mléka od žen v severozápadním Pacifiku a zaznamenali hodnoty CLA v rozmezí $2,23$ do $5,43 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku (průměr $3,81 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku) nebo $0,02$ až $0,30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ na váhu mléka. V této studii, všechny vzorky mléka obsahovaly od 83 do 100% izomeru $c9,t11$ a v 8 ze 14 vzorků, izomer $c9,t11$ byl jedinou formou CLA v mléce. Jensen a kol. zaznamenali nižší hodnotu CLA v mateřském mléce, jejíž rozmezí bylo od $1,4$ do $2,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku s průměrem $1,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku. Na základě těchto dat, CLA v mateřském mléce u západní společnosti kolísala v rozmezí od $1,4$ do $5,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku.

Koncentrace CLA, která se nachází v lidské plazmě a séru závisí na typu potravinového tuku a schopnosti strávit potravu. Herbel a kol. uvádí, že koncentrace CLA v plazmě byla v rozmezí od $6,4$ do $7,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ve studii, kde se osobám podávalo po dobu 6 týdnů vysoké množství světlicového oleje. Vysoký příjem LA ze světlicového oleje nezvýšil hladinu CLA v plazmě, což znamená, že potravní LA se nekonvertuje na CLA u těchto osob [4]. V další studii byl zkoumán účinek příjmu *trans* mastné kyseliny na CLA v séru. Při ukončení studie vzorky séra ze skupiny *trans* diety ($0,43 \%$ CLA nebo $4,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku) obsahovaly o 30% více CLA než vzorky ze skupiny zaměřené na dietu s kyselinou stearovou ($0,32 \%$ CLA nebo $3,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku). Vzorky skupiny na dietě s kyselinou stearovou měly pouze poloviční množství CLA ve srovnání s těmi, kteří drželi *trans* dietu s mléčnými tuky. Tyto údaje ukazují, že existuje možný vztah mezi příjmem *trans* mastné kyseliny a jejím účinkem na zvyšování koncentrace CLA v séru [23].

V jiné studii devíti zdravých mužů byl k jejich dietě přidáván sýr čedar v množství 112 g /den po 4 týdny. Koncentrace CLA v plazmě se zvýšila z $7,1$ na $9,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na konci dietního období a zůstala na $7,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4 týdny poté [4]. Fritsche a kol. uvádí, že lidská podkožní tuková tkáň obsahuje dva hlavní izomery CLA, jak $c9,t11$, tak $t9,t11$, a dva minoritní izomery $t9,c11$ a $c9,c11$ [24].

Vypadá to, že množství izomeru $c9,t11$ $18:2$ v lidské tukové tkáni je přímo závislé na příjmu mléčného tuku. Nicméně, možnost endogenně vyrobené CLA v lidských tkání není vyloučena. Brown a Moore zjistili přítomnost CLA produkované rodem bakterií *Butyrivibrio fibrisolvens* v lidské stolici. Přínos CLA získané ze střev na celkovém podílu v lidské tkáni a u nepřežvýkavých monogastričních druhů je však pravděpodobně bezvýznamný. Dalším možným mechanismem původu CLA v lidské tkáni je desaturace *trans*-vakcenové kyseliny jak ukazují mikrosomální preparace krysích jater [4]. Výsledky Salminen a kol. tento mechanismus dále podporují tím, že vysoké hodnoty potravních *trans* mastných kyselin zřejmě zvýšily obsah CLA v séru [23].

Nicméně, příjem *trans* mastné kyseliny (více než 2 g denně) v této studii byl třikrát až desetinásobně vyšší než je obvyklé. Je nezbytná další studie k určení vlivu exogenního množství potravních *trans* mastných kyselin na koncentraci CLA v lidských tkáních [4].

2.2.7 Obsah CLA v potravinách

V jednom druhu potravin se obvykle nachází více izomerů CLA [25]. Zvýšená pozornost se věnuje zejména izomerům $c9,t11$ CLA a $t10,c12$ CLA, majoritně se vyskytujících v přírodních, především mléčných produktech a v mase přežvýkavců. Jejich obsah se pohybuje v množství od $0,1 \text{ mg}$ až do 4 g na 100 g tuku [1]. Jiný zdroj uvádí množství CLA v rozsahu od $2,7$ až $5,6 \text{ mg CLA/g}$ tuku v jehněčím, telecím, a hovězím.

Obsah CLA může být mnohem vyšší (0,5 až 12 mg CLA/g tuku) v mléčných produktech. Ve většině případech je izomer *c9,t11* nebo-li kyselina bachorová hlavní izomer CLA. Obsah CLA ve vybraných potravinářských výrobcích je uveden v *tabulce 2.8*.

Tabulka 2.8: Obsah CLA a jejich izomerů ve vybraných potravinách [4]

| <i>Produkty</i> | <i>Obsah CLA [mg·g⁻¹ tuku]</i> | <i>c9,t11-18:2 [%]</i> | <i>Produkty</i> | <i>Obsah CLA [mg·g⁻¹ tuku]</i> | <i>c9,t11-18:2 [%]</i> |
|-----------------------|---|----------------------------|-----------------------|---|----------------------------|
| Přírodní sýry | | | Mléka | | |
| Edam | 5,38 | 100 | Kraví | 0,7-10,1 | 59-100 |
| Mozzarella | 4,31 | 84-100 | Ovčí | 10,8-29,7 | 99-100 |
| Parmesan | 1,93-8,6 | 38-100 | Kozí | 6,1-10,35 | 99-100 |
| Masné produkty | | | Další produkty | | |
| Hovězí | 1,2-8,5 | 21-61 | Máslo | 4,7-8,11 | 78-90 |
| Vařené hovězí | 3,3-9,9 | 19-84 | Jogurt | 1,7-9,01 | 71-100 |
| Jehněčí | 5,6 | 92 | Zmrzlina | 3,6-4,95 | 76-86 |
| Kuřecí | 0,9 | 84 | Podmáslí | 4,66-5,4 | 89-100 |
| Vepřové | 0,6 | 82 | Žloutek | 0,00-0,6 | 82 |

Mléčné produkty, speciálně sýr, jsou důležitým potravním zdrojem CLA. Koncentrace CLA v různých mléčných produktech (sýry, mléko, máslo, podmáslí, kysaná smetana, zmrzlina, a jogurt) je v rozsahu od 0,55 až 24 mg·g⁻¹ tuku. Průměrný obsah CLA v mléce je asi 10 mg·g⁻¹ mléčného tuku. Největší střídavé množství CLA je nalezené v různých přírodních sýrech v rozsahu od 0,55 až 24 mg·g⁻¹ tuku. Obsah CLA v sýrech je v první řadě určený obsahem CLA v mléce. Koncentrace CLA kolísá v závislosti na sezónní změně, geografii, výživě krávy a vedení praxe. Navíc, obsah CLA v sýru je také ovlivněn technologickým postupem a zráním [4]. Z výsledků ukončeného EU projektu také plyne, že startovací kultury při výrobě sýra, obsahující *propionibakterie*, dokáží přeměňovat kyselinu linolovou na CLA. Většina závěrů však byla získána při studiích na zvířatech a chybí kvalitní klinické studie se skupinami dobrovolníků [25].

Hodnoty obsahu CLA v hovězí svalovině se značně mění z 1,2 až na 9,9 mg·g⁻¹ tuku. Fritsche a Fritsche oznámili, že množství izomeru *c9,t11* 18:2 v hovězím dával průměrně 0,76 % celkových MEMK (methylesterů mastných kyselin) pro vzorky tuku z býků a 0,86 % pro tuk z býčků. Méně důležité izomery např. *t9,c11*, *c9,c11*, a *t9,t11*, byly také nalezeny ve vzorku hovězího loje. Jiný zdroj uvádí, že obsah *c9,t11* 18:2 v hovězím je v rozsahu od 1,7 až 6,5 mg/g tuku a 0,65 % celkových MEMK v hovězím mase.

CLA je také současně v malém množství v potravinách, které nepochází z přežvýkavců. Pro nepřežvýkavé druhy má krocaní maso nejvyšší obsah CLA 2,5 mg·g⁻¹ tuku. Kuře obsahovalo 0,9 mg CLA/g tuku a vepřové 0,6 mg·g⁻¹ tuku. Z toho byl nejvýznamnější izomer *c9,t11* a tvořil 82 až 84 % všech izomerů. Množství CLA v lipidech kuřecích vaječných žloutků je v rozsahu od 0 až 0,6 mg·g⁻¹ tuku. CLA je také současně v malém množství v rostlinných olejích (0,1 až 0,7 mg·g⁻¹ tuku) a vybraných mořských produktech (0,3 až 0,6 mg·g⁻¹ tuku). Na rozdíl od jídel odvozených z přežvýkavců kde je *c9,t11* hlavní izomer CLA, tento izomer odpovídá jen za 38 až 47 % celkového množství CLA rostlinných olejů a je zajímavé, že se zdá být nepřítomný v lipidech mořských produktů [4].

Tabulka 2.9: Obsah CLA v různých druzích masa a mléčném tuku [2]

| Maso | Obsah CLA [mg·g⁻¹ MK] | | | | |
|-------------------|---|--------------|---------|----------|----------|
| Hovězí | 2,9-4,3 | 5,8-6,8 | 5,6-6,2 | 1,2-3,0 | 4,0-10,0 |
| Jehněčí | 5,6 | 11,0 | 4,3 | | |
| Drůbeží | 0,9 (kuře) | 2,5 (krocan) | | | |
| Vepřové | 0,6 | 0,7 | | | |
| Telecí | 2,7 | 1,3 | | | |
| Koňské | 0,6 | | | | |
| Králičí | < 1 | | | | |
| Mléčný tuk | Obsah CLA [mg·g⁻¹ MK] | | | | |
| Mléčný tuk | 8,2-11,0 | 6-17 | 3-7 | 3,3-11,6 | 6,8-10,1 |

Tabulka 2.9 shrnuje koncentrace CLA nalezené v různých druzích masa. Podle očekávání byly nejvyšší nálezy v případě masa jehněčího a hovězího. U masa telecího záleží na tom, bylo-li z telat z mléčného výkrmu, kdy role bachorového trávení je malá, či z telat po odstavu, kdy v důsledku příjmu rostlinné potravy je bachorová fermentace plně funkční. V ostatních druzích masa je obsah CLA malý (< 1 mg·g⁻¹ tuku). Výjimkou je maso krocana (2,5 mg·g⁻¹ tuku). Tento nález není jednoduché vysvětlit, snad jen mikrobiální činností ve volti. Malé množství CLA v mase králíků je zřejmě důsledkem fermentace v slepém střevu a příjmu cékotrofů [2]. (Cékotrof požírá mazlavé výměšky slepého střeva u hlodavců a zajíců [26].)

Uvádí se, že hovězí maso z Argentiny a Brazílie má vyšší obsah CLA než z jiných oblastí. Schmid a kol. poukazují na velké rozdíly mezi zvířaty a sezónní vlivy. Vysoký je obsah CLA v mase klokanů (38 mg·g⁻¹ MK). Zřejmě je to důsledek pregastrické fermentace, kterou klokani mají. Obsah CLA v mléčném tuku je podobný obsahu CLA v intramuskulárním tuku skotu a ovcí. Při současné nízké spotřebě hovězího masa v ČR (cca 10 kg/osobu za rok) představuje mléko a mléčné výrobky hlavní zdroj CLA ve výživě lidí [2].

Rostlinné oleje (světlicový olej, slunečnicový olej, arašidový olej, kanolový olej, kukuřičný olej, kokosový olej a olivový olej) obsahují velmi nízké množství CLA v rozsahu od 0,1 mg (kokosový olej) do 0,7 mg·g⁻¹ (světlicový olej). Mezi rostlinnými oleji byl nalezen především izomer *c9,t11* 18:2, který odpovídá 37 až 44 % celkového množství CLA. Banni a kol. uskutečnili sérii analýz, které charakterizovaly mastné kyseliny s konjugovanými dieny v částečně hydrogenovaném oleji (směs z částečně hydrogenovaného sojového a palmového oleje) a potvrdili přítomnost izomerů CLA v těchto olejích. Mossoba a kol. oznámili, že konjugované *cis*, *trans* a *trans, trans* 18:2 izomery kyseliny linolové byly přítomny v hydrogenovaném sojovém oleji a margarínu [4].

Pro člověka je zdrojem CLA také kyselina vakcenová, která je obsažena nejen v mase a mléce přežvýkavců, ale i ve ztužených tucích. Není jasné jak na její přítomnost v potravě pohlížet. Všechny ostatní *trans*-nenasyčené MK se považují za látky, jejichž přítomnost v potravinách není žádoucí [2].

2.2.6.1 Odhad alimentárního příjmu CLA

Odhad alimentárního příjmu CLA českou populací by bylo možno učinit výpočtem z průměrné spotřeby masa hovězího (případně i telecího a jehněčího), spotřeby ostatních druhů masa a mléčných výrobků. Nejistá je ovšem koncentrace CLA v těchto produktech.

V ČR navíc není systematicky sledována. K dispozici jsou však odhady alimentárního příjmu CLA v některých dalších zemích, které uvádí Schmid a kol. Ve Švédsku by to mělo být 160 mg/den a v Kanadě 95 mg/den. Vysvětlením je asi nízká spotřeba mléka a masa u dotazovaných osob. V U.S.A. se denní příjem CLA odhaduje na 210 mg u mužů a 150 mg u žen s tím, že maso a výrobky z masa představují asi 37 % alimentárního příjmu CLA. Další údaj, německého původu říká, že průměrný denní příjem CLA je 360 mg u žen a 440 mg u mužů. Z výše uvedených údajů lze dojít k závěru, že odhady alimentárního příjmu CLA jsou v různých zemích rozdílné a zřejmě jsou zatíženy velkou chybou. Problematický může být i způsob, který k odhadu slouží (dotazníky). Nejistota je i ohledně skutečné koncentrace CLA v potravinách, spotřebovaných v dané zemi (přejímání údajů z cizí literatury). Můžeme proto konstatovat, že odhady alimentárního příjmu CLA v různých zemích se „západním“ způsobem stravování kolísají mezi 95 a 440 mg/den [2].

2.2.6.2 Stabilita CLA při skladování

Stabilitou CLA v masu se zabývali Shantha a kol.. Při tepelných úpravách masa jako je vaření, pečení a smažení dochází k mírnému vzrůstu koncentrace CLA. V některých případech je však změna koncentrace CLA nepozorovatelná. Pokud se vařené maso skladovalo 7 dnů při 41°C, docházelo k nárůstu koncentrace látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou, což ukazuje na jeho oxidační poškození. Souběžné měření koncentrace CLA neprokázalo žádné změny. Z toho lze odvodit, že CLA je látka stabilní, která nepodléhá změnám tak jako ostatní polynenasycené MK. Svými vlastnostmi se podobá spíše nasyceným než nenasyceným MK [27].

Na stejném pracovišti byla studována i stabilita CLA obsažené v mléčných výrobcích. Závěry byly stejné. Ani v mléčných výrobcích skladovaných 6 měsíců nedošlo k měřitelnému poklesu koncentrace CLA [28].

2.2.8 Obohacování potravin CLA

Z hlediska dávek CLA přijímaných z potravin se jedná o nízké obsahy. Přirozené zdroje CLA proto nepředstavují významnější zdravotní přínos [10]. Pro dosažení zdraví prospěšných účinků lze použít potravinové doplňky CLA nebo zvýšit obsah CLA v přijímané potravě. Jelikož jsou doplňky méně žádoucí než potrava jako zdroj živin, bylo by daleko lepší zvýšit obsah CLA vytvořením funkčních potravin obohacených o CLA.

Zvýšit množství CLA v potravinách můžeme dvěma způsoby. Jedním způsobem je konzumovat více potravin bohatých na CLA. A druhým způsobem je zvýšit obsah CLA ve vejcích, mléce a masu jako funkčních potravinách živočišného původu. Tento posledně zmíněný přístup je více praktický, protože nezávisí na změně způsobu stravování nebo zvýšení denního příjmu cholesterolu a nasycených tuků. Zvýšení obsahu CLA v potravinových výrobcích jako je mléko a maso, také potenciálně zvyšuje jejich nutriční a terapeutickou hodnotu a mohlo by příznivě ovlivnit marketing těchto potravin. Předpoklad příjmu CLA je v rozsahu 0,3 až 1,5 g/osobu/den a zdá se, že závisí kromě příjmu potravy ze zvířat a rostlinných olejů, také na pohlaví.

Obsah CLA v potravě je ovlivněn mnoha faktory během každého stupně procesu. Tyto faktory zahrnují výrobu surovin, zpracování, balení, skladování a přípravu jídla před podáváním. Původní obsah CLA v surovinách je stanoven při sběru nebo po minimálním opracování.

Ačkoliv následné zpracování, skladování a příprava jídla může ovlivnit obsah CLA do určité míry, tak je tato změna nepatrná ve srovnání s velkou přírodní proměnlivostí zjištěnou zejména u mléčných výrobků. Proto, zaměření na tuto část je cestou k zvětšení obsahu CLA v různých potravinách (mléko, maso, vejce a rostlinný olej). Potravinové výrobky z nepřežvýkavých druhů jako vepřové, drůbeží a ryby mohou být také obohaceny o CLA [4].

Komerčně dostupné přípravky CLA se skládají z téměř stejného množství 9-*cis*,11-*trans* a 10-*trans*,12-*cis* CLA. V jedné studii byl každý izomer rozdělen a upraven, pro použitelnost jako potravinový doplněk, procesem zahrnujícím selektivní esterifikaci s L-mentolem pomocí lipasy *Candida rugosa*, destilací a extrakcí n-hexanem. První selektivní esterifikace izomerů CLA byla provedena při ekvimolárním množství L-mentolu při 30 °C. Olejová fáze reakční směsi byla rozdělena destilací na frakci L-menthyl esteru (obohaceno 9*c*,11*t*-CLA) a frakci volných MK (obohaceno 10*t*,12*c*-CLA). Frakce volných MK byla esterifikována znovu s ekvimolárním množstvím L-mentolu obohaceného 10*t*,12*c*-CLA.

10*t*,12*c*-CLA byla získána destilací frakce volných MK a poté byla zahuštěna na 91 %, ale výtěžek byl 40%. Pro obohacení 9*c*,11*t*-CLA byla frakce L-menthyl esteru v první esterifikaci chemicky hydrolyzována a výsledné volné MK byly esterifikovány znovu s ekvimolárním množstvím L-mentolu. 9*c*,11*t*-CLA přípravek byl získán chemickými hydrolyzami z frakce výsledného L-menthyl esteru a následnou extrakcí n-hexanem. 9*c*,11*t*-CLA byla zahuštěna až na 94 %, ale výtěžek byl 42%. Tento efektivní proces purifikace CLA izomerů za použití L-mentolu je vhodný pro výrobu potravinových doplňků [29].

Komerčně dostupné směsi CLA se od sebe liší obsahem izomerů a jejich stupněm čistoty. Stejně jako skupina přirozených mastných kyselin, tak i CLA se zdála být bezpečnou. Nicméně, přítomnost příměsí a jednotlivých izomerů by mohla navodit nežádoucí vedlejší účinky. Navzdory tomuto potenciálnímu zdravotnímu riziku, jen několik málo přípravků CLA bylo testovaných za přísných podmínek pro klinickou účinnost a bezpečnost. Podle limitovaných dosažitelných výsledků, je možné doporučit přípravky obohacené *c*9,*t*11 a *t*10,*c*12 izomery. Jsou vhodnější pro lidské trávení ve srovnání s přípravky obsahujícími čtyři izomery [30].

Dalším způsobem výroby preparátů je izolace CLA např. z másla. Spíše se však volí druhá cesta, při které se na kyselinu linolovou, nebo na oleje, zejména slunečnicový či saflorový (ze semen světlice barvířské) působí silnými zásadami. Vzniká směs CLA, přičemž kyseliny *trans*-10, *cis*-12 a *cis*-9, *trans*-11 představují asi 40 % z celkového obsahu [10]. Další zdroj uvádí, že preparáty s CLA se vyrábějí nejen ze slunečnicového, ale také z lněného oleje. I přes to, že se nejedná o zdroje nejbohatší, je z nich výroba CLA zatím nejekonomičtější [3].

2.2.8.1 Mléko a mléčné výrobky

Ve státním programu „Rozvoj progresivních metod a postupů na zabezpečení procesu kontinuálního zvyšování kvality a bezpečnosti ve výrobě a kontrole potravin“ se částečná úloha s názvem „Biotechnologické způsoby produkce funkčních složek potravin“ zabývá problematikou CLA. Sleduje se obsah CLA v mléčných potravinách se zaměřením na výrobky z ovčího mléka. Koncentrace CLA v ovčím mléku je vyšší jak v kravském a mění se v závislosti na sezóně. Koncentrace CLA v ovčím mléku se pohybuje od 0,5 % do 2 % z celkového tuku. Nejvyšší koncentrace CLA je v brynze (3 % na tuk). Předmětem dalšího výzkumu projektu je vliv podmínek fermentace a skladování na změnu obsahu CLA v mléčných výrobcích [1].

Studie Dhimana a kol. ukázala, že obsah CLA v kravském mléce se zvýšil lineárně v závislosti na pastvě. Krávy, které se pásly měly o 150 % a 53 % více CLA v mléčném tuku než krávy, které se pásly omezeně a to z 1/3 a 2/3. Zvýšení podílu spasené trávy na pastvě mělo pozitivní efekt na zvýšení obsahu CLA v mléce. Tato studie předpokládá, že α -linolová kyselina (18:3 n-3) by mohla být substrátem pro konverzi na CLA, protože je to převládající nenasycená mastná kyselina, kterou krávy získávají z pastvy. Obsah CLA v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku v závislosti na dietě krav je uveden v *tabulce 2.10*. Je zajímavé, že podávání rybiho masa kravám také vedlo ke zvýšení obsahu CLA v mléce v malém poměru [31].

Tabulka 2.10: Obsah CLA v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku v závislosti na dietě krav [31]

| <i>Produkt</i> | <i>Dieta</i> | <i>Obsah CLA [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku]</i> | <i>c9,t11-18:2 [%]</i> | <i>t10,c12-18:2 [%]</i> |
|--------------------|--------------------|--|----------------------------|-----------------------------|
| Kraví mléko | vysoký obsah obilí | 3,7 | 100 | 0 |
| | 1/3 pastva | 8,5 | 100 | 0 |
| | 2/3 pastva | 13,6 | 100 | 0 |
| | pastva | 21,0 | 100 | 0 |

Loor a Herbein zjišťovali vliv infusí CLA do bachoru dojníc v množství 0 – 180 g/den. CLA obsahovala oba izomery (c9, t11 a t10, c12) v podobném množství. Koncentrace CLA v mléčném tuku se zvyšovala málo. Výtěžek obou izomerů CLA v mléčném tuku byl 6,2 g/den u kontroly a 7,6 g/den při nejvyšší úrovni infuse. To svědčí o tom, že většina CLA je v bachoru hydrogenována. Transfer CLA do mléčného tuku činil jen asi 3 % [32].

Část CLA se po hydrogenaci *cis*- dvojných vazeb změnila na odpovídající *trans*- kyseliny C18:1, které se v tkáních mohou zpětně desaturovat. Při maximální infusi CLA klesala koncentrace tuku a jeho výtěžek v mléce. Bylo to způsobeno potlačením tvorby MK s 6 – 16 atomy uhlíku.

K závěru, že exogenní CLA je v bachoru hydrogenována, došli stejní autoři Loor a Herbein i v dalším pokusu, kdy kombinovali přídatek CLA do krmiva se sojovým a řepkovým olejem. Z výsledků vydedukovali, že pro zvýšení obsahu CLA v mléčném tuku je podstatný dostatek *trans*-11 C18:1, který lze docílit i oleji s vysokým obsahem kyseliny olejové (*cis*-9 C18:1). Bachorové bakterie izomerizují kyselinu olejovou na řadu *trans*- C18:1 kyselin [2]. Lin uvádí, že kyselinu linolovou dokáže přeměnit na CLA extrakt z *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Extrakt této bakterie rovněž konvertoval kyselinu olejovou na CLA, má tudíž aktivitu izomerasovou i desaturasovou. Výsledky pokusu naznačují možnost zvýšení obsahu CLA v mléčných výrobcích [33].

2.2.8.2 Přežvýkavci

Faktory, které ovlivňují výnosy CLA v mléce by měly mít ten samý účinek na maso. Cesta biohydrogenace v bachoru je dobře známá, nicméně účinky polynenasycených mastných kyselin (PUFA) na individuální enzymy (izomerasa a reduktasa) nejsou známy. Zdá se, že n-3 PUFA, které mají tři až šest dvojných vazeb snižují účinnost biohydrogenace zvýšením *trans*-18:1 MK v bachoru a mohou tak usnadnit zvýšení výnosu CLA v mléčném tuku.

Krmení ovcí vysokými dávkami α -linolenové kyseliny vede ke zvýšení obsahu *trans*-18:1 mastných kyselin v bachoru jako výsledku neúplné biohydrogenace. Krmením mladých volů celým lněným semínkem nebo rybím tukem také zvýšilo obsah *trans*-18:1 mastných kyselin v lipidech svalů.

Zvýšený obsah *trans*-18:1 MK v bacheru by mohl být indikací snížené účinnosti procesu biohydrogenace při přeměně *trans*-18:1 MK na kyselinu stearovou. Na druhé straně, snížený účinek biohydrogenace by také mohl vést k akumulaci meziprojektu biohydrogenace CLA z iniciačního kroku procesu. Konec konců by to snížilo konverzi CLA na *trans*-18:1 MK a umožnilo by CLA být k dispozici pro začlenění do lipidů tkání [4].

K podpoře této hypotézy, Enser a kolegové ukázali, že jak lněné semínko tak dávky rybího tuku zvýšily hladinu CLA z 5,7 na 8,0 mg/100 g hovězí svaloviny. Zvýšení CLA bylo dvoj až trojnásobně vyšší ve srovnání s dávkami, které obsahovaly více nasycené tuky (3,2 mg/100 g svaloviny). Dlouhý řetězec n-3 PUFA v rybím tuku způsobil, že hovězí dobytek byl silnější než při konzumaci lněného semínka. Lněné semínko zvýšilo hladinu CLA v lipidech svalů, protože mělo mnohem větší obsah n-3 mastných kyselin (bohaté na 18:3 n-3) než rybí tuk (bohatý na 20:5 n-3 a 22:6 n-3) [34].

Krmení dobytka n-3 PUFA by mohlo mít za následek dvojnásobný zisk. Za první, poskytnutí bohatých zdrojů n-3 PUFA dobytku by zvýšilo obsah CLA nejen v hovězím mase, ale také v mléčném tuku. Za druhé, přínosem CLA je dále zvýšení hladiny n-3 PUFA v mase díky krmení dobytka lněným semínkem a rybím olejem. Modifikované hovězí maso obsahující vyšší hodnoty obou nutričních mastných kyselin je hlavním příkladem funkční potraviny poskytující zdravotní výhody.

Bohužel, existuje silná korelace mezi koncentrací CLA a *trans*-18:1 MK jak v mléce tak v hovězím mase. *Trans*-18:1 MK je známa tím, že zvyšuje hladinu LDL cholesterolu v krvi a jakékoli zvýšení *trans*-mastných kyselin by mohlo být závažným rizikovým faktorem kardiovaskulárních chorob. Malý příspěvek *trans*-18:1 MK v hovězím mase by byl o to méně významný, protože margarín a produkty obsahující hydrogenované rostlinné oleje poskytují v potravě mnohem více *trans*-18:1 MK [4].

2.2.8.3 *Prasata*

Použití CLA ve výživě prasat se těší relativně vyššímu zájmu. Vedle pokusů zaměřených na vliv CLA na růst, konverzi krmiva a obsah CLA v mase existují i studie, které mají spíše charakter základního výzkumu. Např. Kramer a kol. zjišťovali distribuci izomerů CLA přidávané do krmiva v množství 2 % v různých skupinách tkáňových lipidů. Shodu s profilem izomerů CLA diety pozorovali pouze u vnitřního tuku. Fosfolipidy jater byly obohaceny o *c*9, *t*11 CLA, další frakce lipidů jater nikoliv. Lipidy srdečního svalu (vyjma triacylglycerolů) byly obohaceny o *c*11, *t*13 CLA [2]. Ve jiné studii Thiel-Cooper a kol. přidávali až 1 % CLA do krmiva prasat po dobu výkrmu od 26 do 116 kg. CLA zvýšila hmotnostní přírůstky a zlepšila konverzi krmiva. Rovněž snížila výšku hřbetního tuku. S rostoucím přídatkem CLA rostl obsah CLA v podkožním tuku i libové tkáni. Poměr izomerů *c*9, *t*11 a *t*10, *c*12 byl v tkáních vyšší než v dietě [35].

Také Wiegand a kol. pozorovali snížení tloušťky hřbetního tuku u prasat přijímajících CLA (0,75 %) v krmivu. CLA nesignifikantně zvýšila rychlost růstu a signifikantně zlepšila konverzi krmiva [2]. Další práce Smith a kol. je přínosná tím, že prokazuje inhibiční účinek CLA na tkáňovou desaturaci nejen výpočtem indexu desaturace, ale i přímým měřením aktivity stearyl-CoA desaturasy. Toto měření je náročné. Vyžaduje izolaci mikrosomální frakce buněk ultracentrifugací a práci s radioaktivitou. V tukové tkáni se tentokrát více ukládal izomer *t*10, *c*12 CLA než *c*9, *t*11 CLA [36]. Závěrem je možno zmínit práci Corino a kol., která sice konstatuje, že CLA nemá významný vliv na růst prasat a kvalitu masa, avšak uvádí, že změny ve složení MK zlepšují technologické vlastnosti masa [2].

2.2.8.4 Drůbež

Jiní badatelé studovali vliv CLA na složení mastných kyselin ve vaječném žloutku a kvalitu vajec. V nedávném experimentu, Watkins a kol. podali slepicím Single Comb White Leghorn, druhu vyšlechtěném člověkem, gelové kapsle obsahující 1 g buď CLA (55 až 56% CLA) nebo světlivového oleje. Těchto 40 slepic bylo rozděleno do čtyř skupin: skupina 1 sloužila jako kontrolní (nedodával se jí olej), skupina 2 dostala jednu kapsli CLA každý druhý den, skupina 3 dostala jednu kapsli CLA každý čtvrtý den a skupina 4 dostala jednu kapsli světlivového oleje každý druhý den. Přídavek CLA neovlivnil snášení vajec, ale ovlivnil množství CLA ve vaječných žloutcích. Množství CLA kolísalo v rozmezí 0,7 až 1,2 % celkových mastných kyselin obsahujících různé izomery (*c*, *t/t*, *c* 9,11, *t*10,*c*12, *c*9,*c*11 a *c*10,*c*12). Ve studii dále zjistili, že se obsah CLA ve žloutku snížil během dlouhodobého skladování až 6-ti měsíců při nízké teplotě (4 až 6°C) [4].

Účinky CLA (až 1,5 %) u kuřecích brojlerů popisují Szymczyk a kol. CLA signifikantně snížila příjem krmiva a rychlost růstu, zejména při vyšší koncentraci v krmivu. Rovněž snížila ukládání abdominálního tuku. CLA dále zvýšila podíl nasycených MK na úkor nenasyčených MK v tkáňových lipidech a její koncentrace v tkáních byla přímo úměrná koncentraci v krmivu. Pozornost byla věnována i různým účinkům CLA u nosnic. Jedním z důvodů byla i snaha, ověřit přestup CLA do vajec s cílem, učinit tento produkt zajímavějším pro spotřebitele [2]. Výsledky rozsáhlého pokusu zveřejnili Raes a kol. Autoři použili dva různé preparáty CLA lišící se poměrem izomerů. CLA v množství 1 % diety kombinovali s olejem sojovým, lněným nebo živočišným tukem. CLA neměla vliv na příjem krmiva, snášku a obsah cholesterolu v žloutku, signifikantně však zvýšila nasycené MK na úkor mononenasycených MK a kyseliny arachidonové. Obsah CLA v žloutku činil až 5,3 % MK. Izomer *c*9, *t*11 CLA se inkorporoval ve větší míře než *t*10, *c*12 CLA. V jednom vejci bylo 130 – 250 mg CLA. Ke změně profilu MK stačilo 10 dnů [37].

Další práce představuje studie španělských autorů. Alvarez a kol. kombinovali přídavek CLA (1–5 g·kg⁻¹) s rybím olejem. CLA neměla vliv na produkci vajec, zvýšila však obsah nasycených MK a PUFA řady n-3 v žloutku na úkor MK mononenasycených. CLA se do vajec dobře ukládala. Její retence ve vejcích činila 15,1 % příjmu. Přídavek rybího oleje retenci CLA snižoval.

Velké změny v profilu MK byly pozorovány již při přidavku pouze 1 g CLA/kg krmiva. CLA také zvýšila tuhost žloutku po uvaření, přičemž přídavek rybího oleje tuto změnu neovlivnil [2]. Přínosná je i práce, kterou publikovali Husvéth a kol. Nosnice v jejich pokuse přijímaly 1,1 g CLA/den. Obsah CLA v žloutku se zvýšil již po týdnu podávání. Retence CLA ve vejcích byla cca 9 %. CLA zvýšila zastoupení nasycených MK palmitové a stearové v žloutku a játrech, ne však v tukové tkáni. Z toho autoři usuzují nízkou aktivitu desaturas v tukové tkáni nosnic. V žloutku, játrech i tukové tkáni výrazně převládal izomer *c*9, *t*11 CLA nad ostatními [38].

Přehlédnout nelze ani práci kolektivu Yang a kol., která se zabývá distribucí izomerů CLA v tkáních nosnic v jejichž dietě bylo 1,68 % CLA. CLA se ukládala ve všech tkáních vyjma mozkové. V játrech představovala 2,8 % MK, v mase méně, v tuku 4,1 % MK. Ukládání CLA v tkáních bylo pro různé izomery selektivní. Obsah *cis-trans* izomerů byl v tkáních nižší než v krmivu. Obsah *trans-trans* izomerů byl naopak vyšší. Je možné, že *trans-trans* izomery se metabolizují pomaleji a v tkáních proto přetrvávají déle [2].

2.2.8.5 Králíci

V roce 1994 Lee a kol. popsali účinky CLA podávané dospělým králíkům v množství 0,5 g/den po 22 týdnů, současně s cholesterolem a rostlinným olejem. CLA neměla vliv na příjem krmiva. Během pokusu se u králíků zvyšoval obsah triacylglycerolů a cholesterolu v plasmě. CLA snížila koncentraci cholesterolu, ale až po 10 týdnech podávání. Po 8 týdnech CLA snížila rovněž koncentraci triacylglycerolů. U králíků pokusné skupiny bylo sníženo ukládání cholesterolu v aortě. V obdobně uspořádaném experimentu Kritchevsky a kol. zjistili, že k prevenci atherogeneze stačí i nízká koncentrace CLA, pouze 1 g·kg⁻¹ krmiva.

Corino a kol. do krmiva králíků přidávali CLA až 0,5 % po dobu 3, 5 a 7 týdnů. CLA neměla vliv na růst ani spotřebu krmiva. V plasmě CLA signifikantně snížila koncentraci triacylglycerolů a cholesterolu a nesignifikantně zvýšila aktivitu leptinu. U králíků, kteří dostávali CLA 7 týdnů došlo k snížení hmotnosti ledvinového tuku. Jiné jatečné parametry ovlivněny nebyly. Maso králíků, kteří přijímali více CLA mělo lepší oxidační stabilitu.

V navazujícím pokuse, se stejným metodickým uspořádáním Corino a kol. potvrdili, že CLA nemá vliv na růst, příjem krmiva a konverzi krmiva u králíků. Jistý vliv CLA na kvalitu masa existuje. CLA signifikantně zvýšila obsah vody v masě a poměr voda/protein. CLA také signifikantně snížila obsah tuku v masě u králíků s nejvyšší porážkovou hmotností 3,1 kg [2].

2.2.8.6 Ryby

Ryby jsou důležitým zdrojem potravních proteinů a prospěšných mastných kyselin, které slouží jako důležité spojení mezi příjmem 3 PUFA a snížením rizika rakoviny a výskytu arteriosklerózy [4]. Twibell a kol. testovali účinky potravní CLA na růst ryb, kompozici tukových mastných kyselin a uložení tuku v těle, poskytnutím potravy obsahující CLA (0,5, 0,75, a 1,0 % z celkové potravy) mladým křížencům okouna pruhovaného. Po 8 týdnech krmení touto potravou, ryby, které dostávaly CLA (0,5 a 0,75 %) vykazaly snížený příjem potravy bez zjevné změny růstu.

Nieméně, ryby na 1,0% CLA dietě dosáhli menší váhy ve srovnání s rybami na kontrolní dietě. Izomery CLA byly detekovány v játrech a svaích ryb. Celková koncentrace CLA v játrech u ryb krmených 0,5, 0,75, a 1,0 % CLA byla 2,8, 2,5, a 5,8 % mastných kyselin. O více CLA byly obohaceny svaly ryb, které obsahovaly 3,4; 4,4; a 8,1 % CLA celkových mastných kyselin. Rybí intraperitoneální tuk (intraperitoneální tuk x 100/váhu těla) byl podstatně snížen u ryb krmených 1,0 % CLA [39].

2.2.8.7 Rostlinné oleje

Rostlinné oleje by mohly být obohaceny o CLA selektivní hydrogenací. Po 60 minutách selektivní hydrogenace bylo složení mastných kyselin u částečně hydrogenovaného sojového oleje téměř identické s původním olejem (až na malou změnu v hodnotách jódu). Proto je možné vytvořit vyšší obsah CLA v sójovém oleji bez změny koncentrace hlavních mastných kyselin za použití limitní (30 až 60 min) selektivní hydrogenace [40].

Vznik CLA během hydrogenace velmi závisí na typech a době trvání hydrogenačního procesu. Selektivní hydrogenací by se obsah CLA mohl zvýšit až na 98 mg·g⁻¹ oleje. Obsah CLA, vyplývající z testů používajících selektivní hydrogenaci sójového oleje, byl mezi nejvyššími zaznamenanými v potravě.

Ačkoliv by CLA mohla být vyráběna touto metodou, distribuce izomerů byla úplně odlišná od přirozeně se vyskytující CLA nalezené v potravinách ze zvířat. Hydrogenovaný sójový olej v této studii obsahoval vysoké hladiny *trans,trans* CLA izomerů v hodnotách od 32,8 do 60,2 %. Procento izomerů CLA *c9,t11* a *t10,c12* se snížilo se zvýšením času hydrogenace. Hodnota vyráběného rostlinného oleje bohatého na CLA musí být stanovena poté, co bude dostupných mnohem více informací o biochemických a fyziologických účincích jednotlivých izomerů CLA [4].

2.2.9 Analytické stanovení CLA

Analýzy CLA v potravinách a dalších biologických vzorcích doprovází směrnice pro stanovení složení mastné kyseliny s důrazem na derivatizaci metody. Konjugované dvojné vazby v CLA jsou méně stálé než methylenové přerušené dvojné vazby v LA. Uvádí se, že stabilita CLA je podobná kyselině arachidonové (20:4 n-6) a kyselině dokosaheptaenové (DHA, 22:6 n-3). Pro úspěšnou analýzu je důležité chránit vzorek CLA před oxidací, protože mastné kyseliny jsou oxidačně labilní.

Analýzy lipidů mastných kyselin mají tři základní kroky: extrakce lipidů, derivatizace mastné kyseliny a analytické stanovení. Pro vzorky jako jsou oleje a tuky z rostlinných a zvířecích zdrojů, extrakce lipidů není nutná. Produkty mastné kyseliny pak mohou být kvantifikovány chromatografií. Často se používá plynový chromatograf (GC) a vysoce účinný kapalinový chromatograf (HPLC).

Nejvíce se pro analýzu mastných kyselin používají MEMK. Pro přípravu MEMK je dostupných mnoho metod, ale jen málo jich je vhodných k analýzám CLA [4]. Obecně se MEMK získávají alkalicky katalyzovanou methanolýzou olejů [41].

Derivatizace mastné kyseliny je kritická část jakékoliv analýzy mastné kyseliny. Pro přípravu MEMK mohou být použity jak kyseliny, tak alkalické katalyzátory. Kyselina katalyzuje metody obsahující BF_3 (10 až 14 %, w/v) v methanolu, BCl_3 (10 %, w/v) v methanolu, bezvodou HCl (5 %, w/v) v methanolu a koncentrovanou kyselinu sírovou (1 až 2 %, v/v) v methanolu. Dvě základní metody katalýzy využívají 0,5 *N* methoxid sodný a tetramethylguanidin (TMG) v methylalkoholu (1:4, v/v).

Alkalické katalýzy účinkují lépe na lipidy obsahující mastné kyseliny s jediným konjugovaným dienem. Izomerizace a artefakty nejsou produkovány když jsou jako transesterifikační činidlo používány methoxid sodný nebo TMG; nicméně, nemethylují volné mastné kyseliny, ale mastné kyseliny spojené *N* (amidovou vazbou). Ačkoli původní autor metody TMG tvrdil, že tato metoda pracuje dobře s volnými mastnými kyselinami, nedávné testy ukázaly různé výsledky. Z těchto výsledků plyne, že TMG není účinný v methylaci volných mastných kyselin a fosfolipidů. Tyto metody nejsou vhodné pro vzorky s vysokými čísly kyselosti (vysokými obsahy volných mastných kyselin) [4].

Již dávno předtím, než se CLA stala předmětem fyziologicky zaměřených studií, byla známa coby meziprodukt bachorové hydrogenace polynenasycených MK. Plynové chromatografy byly v té době vybaveny náplňovými kolonami, jejichž separační účinnost nebyla dostatečná k rozdělení celého spektra MK, které se v biologickém materiálu nachází. Postup stanovení byl proto složitější a sestával z více kroků. Příkladem může být stanovení produktů hydrogenace nenasycených MK tak, jak je uvádí Mills a kol. Plynovou chromatografií rozdělili MK na monoenoové, dienoové a trienové. Tyto frakce rozdělili chromatografií na tenké vrstvě silikagelu impregnovaného AgNO_3 . Impregnace stříbrnými ionty umožňuje dělit *cis*- a *trans*- izomery.

Di- a trienové frakce redukovali hydrazinem na monoeny, ty opět dělili na tenké vrstvě a po eluci skvrn oxidovali monoeny $\text{KJO}_4/\text{KMnO}_4$ kvůli zjištění polohy dvojné vazby. Vzniklé dikarboxylové kyseliny esterifikovali methanolem a dimethylestery identifikovali plynovou chromatografií [2].

Skleněná kapilára plynového chromatografu s FFAP (fáze pro volné mastné kyseliny) pokrytým sloupcem byla užívána pro určování izomerních nenasycených mastných kyselin v požitelných tucích. Dasgupta a kol. podali zprávu o použití chloridu železitého v methylalkoholu jako činidla k přeměně mastné kyseliny na jejich methylestery po 10 min zpětného toku před analýzami na plynovém chromatografu a Wilson popsal rychlou metodu plynové chromatografie pro určení kyseliny v oleji řepkového semena za účelem vyhovět legislativním požadavkům [42].

Zjednodušení analýzy bylo umožněno zavedením 60 m a 100 m kapilár. Na plynovém chromatografu lze přímo stanovit 2 až 4 izomery CLA. Dokonalejší rozdělení izomerů CLA je možné pomocí HPLC po vybavení spřaženými (2 i více) kolonami s náplní impregnovanou stříbrem (opět, pro dělení *cis*- a *trans*- izomerů). S detektorem UV-VIS jsou při 232 nm detekovány pouze MK s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Podle jemných rozdílů v absorpčním maximu lze rozlišit izomery *cis-cis*, *cis-trans* a *trans-trans*. Účinnost tohoto postupu dokládá práce, ve které její autoři v mase býků identifikovali 14 izomerů CLA [2].

Separace izomerů *trans-7,cis-9*, *cis-9,trans-11*, a *trans-8,cis-10* CLA byla studována také GC na 200 m dlouhé kapilární koloně pokryté kyanopropyl silikonovou fází při 130 °C. Rozlišení těchto CLA izomerů získaných při daných experimentálních podmínkách nebylo dostatečně vysoké pro přímé kvantitativní analýzy, ale bylo postačující pro stanovení jejich ploch píku komerčním dekonvolučním (rozdělovacím) softwarem. Relativní retenční a rozlišovací faktory izomerů CLA s překrývanými píky stanovenými pomocí separace směsi komerčního standardu CLA stejně jako části CLA izomeru získaných pomocí HPLC částečnou úpravou ovčího mléka, které byli použity jako vstupní údaje v dekonvoluční proceduře. Mléko ovcí, které byly paseny, s vyšším obsahem izomeru *cis-9,trans-11* ukázaly vyšší obsah *trans-7,cis-9* právě tak jako *trans-8,cis-10* CLA izomery ve srovnání s mléčným tukem dokonale promísených poměrů (TMR) krmných směsí ovcí. U vzorku kravského mléka, které měli nižší obsah CLA, žádný takový znak nebyl evidentní [43].

Další techniky mohou být užívány pro určování strukturní konfigurace neznámých izomerů CLA, které mohou být méně časově náročné než kombinování rozborů GC a HPLC. Pro získání většího detailu izomeru CLA, mohou být použity následující metody: GC-elektronová ionizace s hmotnostní spektrometrií (GC-EIMS), GC-přímé vložení-Fourierova transformace infračervené spektroskopie (GC-DD-FTIR) [4]. Za použití těchto, metod byly nalezeny v tukové tkáni metyl ester a 4,4-dimethyloxazolin (DMOX) deriváty geometrických izomerů *cis-9, trans-11* a *trans-9, trans-11* oktadekadienové kyseliny a dva minoritní izomery *trans-9, cis-11*- a *cis-9, cis-11*-oktadekadienové kyseliny [21].

Dále se pro získání většího detailu izomeru CLA používá nukleární magnetická resonance (NMR) a ^{13}C NMR [4]. Komerčně dostupná směs CLA se často skládá z téměř stejného množství *cis-9, trans-11* a *trans-10,cis-12* izomerů. Rozdělení těchto dvou izomerů je velmi důležité, protože každý izomer má různé biochemické vlastnosti. Vysoce účinné rozdělení by mohlo být provedeno krystalizací těchto izomerů v acetonu v přítomnosti mastných kyselin o střední délce řetězce (MCFA). Přidání kyseliny laurové a dekanové mělo za následek krystaly převážně obsahující izomer *t10,c12*, kdežto v přítomnosti kyseliny oktanové vykryštoval převážně izomer *c9,t11* [44].

2.3 Plynová chromatografie

V této práci byla pro stanovení CLA a linolové kyseliny použita GC.

2.3.1 Princip

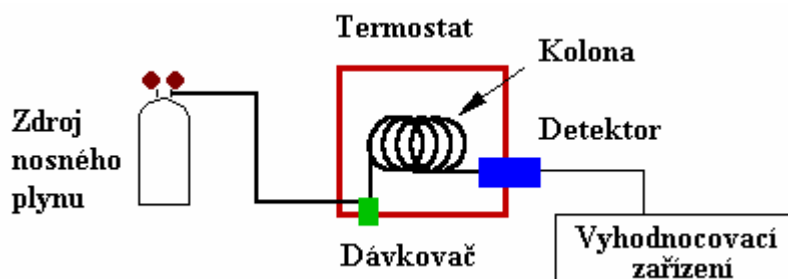
Plynová chromatografie patří mezi separační metody, při nichž dochází k distribuci plynů a par separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází [45]. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá [46]. Cílem chromatografického procesu je rozdělit vzorek na jednotlivé složky. Nosný plyn protéká kolonou a unáší s sebou nastříknutý vzorek. Při tom dochází k interakci mezi vzorkem a stacionární fází, při čemž jsou jednotlivé složky různě pevně zadržovány. Podle stupně zadržení pak vystupují dříve či později [45]. Složky opouštějící kolonu vstupují do detektoru. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [46].

Doba, která uplyne od okamžiku vnesení vzorku do výstupu inertní, nesorbované složky, se nazývá *mrtvý čas* (t_M) a doba průchodu sorbované látky se označuje jako *retenční (eluční) čas* (t_R). Metodu plynové chromatografie lze použít k dělení látek, které se při zplyňování nerozkládají ani nepodléhají jiné nežádoucí změně složení [45].

2.3.2 Instrumentace plynového chromatografu

Plynový chromatograf se skládá z čistícího zařízení, regulátorů používaných plynů, dávkovače, kolony, detektoru, vyhodnocovacího zařízení a termostatu.

Schéma plynového chromatografu [47]



2.3.2.1 Zdroj nosného plynu

Mobilní fází v plynové chromatografii je plyn. Protože se mobilní fáze účastní přenosu látek chromatografickou kolonou, vžil se pro něj název nosný plyn [48]. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, kysličník uhličitý, helium nebo argon. Volba nosného plynu je určena druhem kolony a detektoru [46, 45].

2.3.2.2 Čistící zařízení

Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů. Zejména odstraňuje stopy reaktivního kyslíku, který nevratně poškozuje stacionární fází v koloně [46].

2.3.2.3 Regulační systém

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Elektronickou regulací lze docílit stanoveného průtoku i při změnách teploty během separace [46].

2.3.2.4 Dávkovač

Dávkovač slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky dávkujeme injekčními stříkačkami (0,1 – 10 µl) přes pryžové septum. Pro plynné vzorky se používají plynotěsné injekční stříkačky nebo obtokové dávkovací kohouty různých konstrukcí [46].

Dávkování vzorku se provádí:

Dávkování s děličem toku (*split injector*) – u vzorků obsahujících velké množství analyzovaných komponent, pro vlastní analýzu je používáno 0,1 - 10 % vzorku a zbytek je oddělen do odpadu.

Dávkování bez děliče toku (*splitless injector*) – při analýze zředěných vzorků, používá se asi 80 % vzorku, aby se zabránilo rozšiřování zóny, tzv. „chvostování píků“.

Dávkování přímo do kapilární kolony (*on column injector*) – pro analýzu vzorků, jejichž složky se těsně nad bodem varu rozkládají [49].

2.3.2.5 Kolona

Vlastnosti chromatografické kolony rozhodují o kvalitě a kvantitě informací, které lze jejím použitím získat [45]. Chromatografické kolony v plynové chromatografii lze charakterizovat jako náplňové a kapilární [48].

Náplňové kolony – jsou trubice, které mohou být naplněné jak tuhým zrnitým adsorbentem, tak kapalinou zakotvenou na vhodném nosiči. Klasické náplňové kolony se nejčastěji vyrábějí z nerezové oceli, hliníku, Teflonu, polyethylenu a skla. Mikronáplňové kolony se nejčastěji vyrábějí ze skla [48].

Kapilární kolony – využívají jako nosiče stacionární fáze své vnitřní stěny [46]. Nejčastěji se vyrábějí ze skla, taveného křemene a nerezové oceli.

Kapilární kolony dělíme na:

WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) – kolony s kapalinou zakotvenou na vnitřních stěnách kapilární trubice.

SCOT (*Support Coated Open Tubular*) – kolony s kapalinou zakotvenou na nosiči, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry.

PLOT (*Porous Coated Open Tubular*) – kolony s adsorbentem, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry [48].

2.3.2.6 Termostat

Termostat zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Dávkovač a detektor mají zpravidla vlastní řízené zahřívání. Konstantní teplota pro izotermický proces je využitelná, neliší-li se analyty příliš svými teplotami varu [46].

2.3.2.7 Detektor

Detektory jsou zařízení, jejichž úkolem je detekovat v nosném plynu složky, které opouštějí chromatografickou kolonu [48]. Reagují na změnu složení plynu, který jím právě prochází [45]. Od detektoru se vyžaduje rychlá odezva, velká citlivost a stabilita základního signálu. Podle dějů probíhajících při detekci je možno detektory rozdělit na nedestrukční a destrukční.

Nedestrukční detektory – látka prochází detektorem bez toho, aniž by se chemicky změnila. Mezi tyto detektory patří např.: tepelně vodivostní detektor (TCD), detektor elektronového zachytu (ECD), argonový a heliový detektor.

Destrukční detektory – látka se při detekci ireverzibilně změní. Patří sem plamenový ionizační detektor (FID), termoionizační detektor (TID), plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID) [46, 48].

FID (*Flame Ionization Detector*) – je nejpoužívanější detektor v plynové chromatografii. V plazmě vodíkového plamene, který hoří mezi dvěma elektrodami, dochází k ionizaci molekul vymývaných z kolony. Tepelnou energií, která se uvolňuje při hoření, se štěpí chemické vazby organických látek za vzniku radikálů, které reagují s vodíkem v redukční zóně plamene za vzniku radikálů $\cdot\text{CH}$. Tyto radikály se v oxidační zóně plamene oxidují za vzniku iontů CHO^+ a elektronů, což je rozhodující pro odezvu detektoru. FID není citlivý na sloučeniny, které termickým štěpením neposkytují radikály $\cdot\text{CH}$.

TCD (*Thermal Conductivity Detector*) – principem detekce je odvod tepla z rozžhaveného odporového vlákna plynem vytékajícím z kolony.

ECD (*Electron Capture Detector*) – principem ECD je zachycování elektronů elektronegativními atomy, funkčními skupinami nebo molekulami.

TID (*Thermal Ionization Detector*) a **AFID** (*Alkali-Flame Ionization Detector*) – principem detekce je měření koncentrace iontů alkalického kovu v efektivním prostoru detektoru [46, 48].

2.3.2.8 Vyhodnocovací zařízení

Vyhodnocovací zařízení zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku (chromatogram) a provádí její vyhodnocení [46]. Z chromatogramu můžeme získat informace pro kvalitativní i kvantitativní analýzu a pro hodnocení účinnosti separačního systému. [48].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- Heptan CHROMASOLV[®] >99 %, SIGMA ALDRICH
- Methanol p. a., LACH-NER, s.r.o
- Methyloranž indikátor, FISHER SCIENTIFIC, spol. s.r.o.
- Hydroxid draselný p. a., LACHEMA, a.s., Brno, závod Neratovice
- Kyselina sírová chem. čistá (min. 96%), LACHEMA, a.s., Brno.
- Standard – směs methylesterů mastných kyselin, SUPELCO

3.1.2 Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem a kovovou membránou
- Vodík 5.5 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem pro kyslík

3.1.3 Přístroje

- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie
- Chladnička s mrazničkou Amica, model AD 250
- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, opatřený split/splitless injektorem a kapilární kolonou SPTM-2560 (100m × 0,25mm × 0,2μm).
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Sušárna MEMMERT
- Topné hnízdo LTHS 200

3.1.4 Pracovní pomůcky

- Vialky o objemu 2 ml se šroubovacími uzávěry a septy
- Injekční stříkačka HAMILTON 10 μl
- Mikropipety Biohit-Proline o objemu 0,5 – 1000 μl
- Držáky, stojany
- Kádinky, destilační baňka
- Odměrné baňky, odměrné válce
- Zpětný chladič, dělicí nálevka
- Špachtle, lžíce, tyčinky
- Gumové rukavice, ochranné brýle
- Varné kamínky, pryžové hadice
- Parafilm (4 IN. x 125 FT. Roll), Pechiney Plastic Packaging, MENASHA

3.2 Použité standardy a vzorek

3.2.1 Standard č. 1

Název výrobku: Methyl linoleate

Značka: Sigma Aldrich

Koncentrace: 0,22 mg·ml⁻¹ n-heptanu

3.2.2 Standard č. 2

Název výrobku: Linoleic acid, conjugated methyl ester

Značka: Sigma Aldrich

Koncentrace: 250 mg·ml⁻¹ n-heptanu

3.2.3 Vzorek

Název vzorku: CLA

Značka: Vitaland

Číslo šarže: 071123

Expirace: 15.11.2009

Složení: směs nenasycených mastných kyselin, konjugovaná kyselina linolová, želatina, barviva (oxidy železa, titanová běloba)

Složení 1 kapsle: směs nenasycených mastných kyselin 1000 mg z toho CLA 600 mg.

3.3 Příprava

3.3.1 Příprava standardu

Standardy byly ředěny heptanem na požadované koncentrace a následně byly měřeny tak, aby uplynula mezi ředěním a analýzou co nejkratší doba. Naředěné standardy totiž nemohou být dlouho uchovávány v lednici, protože dochází ke ztrátám způsobeným těkavostí nejen obsažené mastné kyseliny, ale také heptanu. Těkavost MK se dá omezit uchováváním v mrazáku ve vialkách se šroubovacími uzávěry opatřenými plynotěsným septem, případným potažením folií.

3.3.2 Příprava vzorku

Vzorek byl nejprve izolován z tobolky postupem uvedeným níže a před analýzou byl naředěn n-heptanem na potřebnou koncentraci.

Izolace MK ze vzorku - esterifikace pomocí methanolového roztoku KOH:

Princip: Triacylglyceroly jsou reesterifikovány methanolem na methylestery mastných kyselin, které se stanoví plynovou chromatografií [50].

Příprava roztoků: 0,5 M roztok hydroxidu draselného v methanolu: 14 g pevného hydroxidu draselného se rozpustí ve 10 ml destilované vody a doplní na objem 500 ml methanolem. 0,1% methylořanž: 0,1 g methylořanže se rozpustí ve 100 ml destilované vody.

Postup: K tobolce CLA o hmotnosti 1,4009 g bylo kvantitativně přidáno 20 ml methanolového roztoku hydroxidu draselného a tobolka byla zmýdelňována po dobu 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení byla reakční směs neutralizována koncentrovanou kyselinou sírovou na methylořanž až do růžového zbarvení. Po neutralizaci byla přidána kapka kyseliny sírové navíc a poté byla provedena reesterifikace varem po dobu 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení byly methylestery mastných kyselin vytřepány 10 ml n-heptanu. Methylestery CLA byly až do analýzy plynovou chromatografií uchovávány v lednici [50].

3.4 Analýza methylesterů mastných kyselin

Standardy i vzorek byly po naředění dávkovány ručně injekční stříkačkou HAMILTON do plynového chromatografu TRACE GC (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie) a proměřovány za těchto podmínek:

- Nosný plyn: Dusík; optimální průtok $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
- Dávkování: ručně – $1 \mu\text{l}$; splitless injection.
- Teplota injektoru: $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Teplotní program: $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 minuty; vzestupný gradient $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu do $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ s výdrží 20 minut.
- Kolona: Kapilární; SPTM-2560 o rozměrech: $100 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,2 \mu\text{m}$.
- Detektor: Plamenově ionizační (FID), $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$; průtok vodíku $35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, vzduchu $350 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, make-up dusíku $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
- Celková doba analýzy: 38 minut.

3.5 Metrologické charakteristiky metody

3.5.1 Validace

Validace je proces, při němž se určuje vhodnost použití daného analytického systému pro získání relevantních dat. Při validaci metody posuzujeme, zda parametry metody jsou srovnatelné s požadavky na analytická data a výsledky. Mezi validované parametry patří: specifičnost, selektivita, kalibrace, linearita, citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti, robustnost metody, správnost (výťažnost) a přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost) [51]. Validace je zjednodušeně řečeno ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody) [52].

3.5.2 Validované parametry

3.5.2.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost je míra těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného vzorku analytu provedených stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku. Podmínky opakovatelnosti jsou ty, při nichž se nezávislé výsledky zkoušek získají toutéž metodou, na identických zkoušených jednotkách, v téže laboratoři, týmž operátorem, za použití téhož vybavení, během krátkého časového rozmezí [53].

Aritmetický průměr - \bar{x}

Aritmetický průměr \bar{x} je nejlepším odhadem střední hodnoty [54].

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

n.....je počet měření.

Směrodatná odchylka - s

Rozptýlení jednotlivých hodnot x_i okolo průměru \bar{x} je zpravidla charakterizováno hodnotou směrodatné odchylky. Směrodatná odchylka (SD) je tedy mírou přesnosti výsledků stanovení [55].

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

Relativní směrodatná odchylka - s_r

Relativní směrodatná odchylka (RSD) se používá pro porovnání směrodatné odchylky s průměrem série měření. RSD vyjadřuje směrodatnou odchylku jako procento z průměru [51].

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3)$$

3.5.2.2 Linearita

Linearita analytické metody je schopnost získat výsledky zkoušek, které jsou (v daném rozsahu) přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku [51]. Vztah závisle proměnné (obvykle určované měřením) k nezávisle proměnné, (jejíž správné hodnoty známe) je *regresní závislost* [56].

Lineární regresní závislost je vyjádřena vztahem:

$$y = a + bx \quad (4)$$

a úsek posunutí

b směrnice kalibrační přímky (regresní koeficient) [52].

Pokud je hodnota závisle proměnné i nezávisle proměnné určována měřením, jejich vztah je nazýván *korelací* [56] Pro lineární závislost se pak může korelační koeficient r odhadnout takto:

$$r = \frac{\sum(x_i \cdot y_i)}{\sqrt{(\sum(x_i)^2)(\sum(y_i)^2)}} \quad (5)$$

Pro počet vzorků známého obsahu analytu x_i se určí odpovídající intenzita signálu y_i , pak pro každou z naměřených hodnot se vypočítá odchylka od průměru $Y_i = y_i - \bar{y}$ a $X_i = x_i - \bar{x}$, kde \bar{y} je průměr hodnoty y_i a \bar{x} je průměr hodnoty x_i .

Hodnota korelačního koeficientu nesmí klesnout po hodnotu 0,98 [52].

3.5.2.3 Mez detekce

Mez detekce (LOD – Limit Of Detection) analytu je obecně nejnižší množstvím analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota. [51].

U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že jsou k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu [52].

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu a vyjadřuje se jako trojnásobek šumu základní linie:

$$\text{LOD} = 3 \cdot \frac{h_n}{m} \quad (6)$$

h_n šum na základní linii

m směrnice kalibrační přímky ($f(c) = h$ je závislost výšky píku na koncentraci) [57].

3.5.2.4 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti (LOQ – Limit Of Quantitation) je nejnižší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti [51].

U separačních metod se používá k výpočtu meze stanovitelnosti velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že jsou k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu [52].

Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení a vyjadřuje se jako desetinásobek šumu základní linie:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{h_n}{m} \quad (7)$$

h_n šum na základní linii

m směrnice kalibrační přímky [57].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo vypracovat a ověřit metodu vhodnou pro stanovení CLA s využitím GC. Vzhledem k nízké těkavosti se MK většinou stanovují jako estery, nejčastěji methylestery, neboť jsou podstatně těkavější než jim odpovídající kyseliny. Podmínky GC analýzy byly převzaty z předchozí diplomové práce, která se zabývala problematikou stanovení MK v potravinách [58].

4.1 Optimalizace pracovních podmínek v plynové chromatografii

Jedním z cílů GC analýzy je rozdělení složek vzorku v co nejkratším čase [48]. Schopnost chromatografického systému oddělit separované složky tak, aby byla umožněna samostatná eluce každé složky, je označována jako *účinnost separace* [49].

Separace složek v GC ovlivňuje především:

- **teplota separace** (izotermické separace, separace při programované teplotě a jejich kombinace).
- **selektivita stacionární fáze**
- **separační účinnost chromatografické kolony** (počet teoretických pater, apod.) [48]

Oddělení složek lze ovlivnit dvěma způsoby:

- zásahy do chromatografického systému, které **změní sílu interakce mezi složkami vzorku a sorbentu** – *termodynamický aspekt separace*
- zásahy do chromatografického systému, které **ovlivní šířky zón eluujících složek** – *kinetický aspekt separace*

K dispozici byla kapilární kolona SPTM-2560 (100m × 0,25mm × 0,2μm) s fází nevázaného biskyanopropyl polysiloxanu [59]. Kapilární kolony se doporučují především pro analýzu obtížně dělitelných typů izomerů a pro analýzu složitých mnohosložkových směsí. Technika dávkování bez děliče toku (*splitless*) je spojena s technikou programování teploty, kdy zplyněný vzorek vstupuje do poměrně chladné vstupní části kolony a teprve se zvyšováním pracovní teploty v termostatu se pohybují ostře oddělené zóny po koloně [45].

Na základě těchto skutečností se tato práce zaměřila na optimalizaci teplotního programu a prakticky se nezabývá vlivem kinetického aspektu separace. Optimalizace teplotního programu byla provedena za účelem zkrácení doby analýzy. Dalším parametrem, který má vliv na délku analýzy je průtok, ten byl však ovlivňován minimálně. Ostatní podmínky, které jsou uvedeny výše (kap. 3.4) zůstaly zachovány. Obecně platí, čím větší průtok a vyšší teplota, tím kratší doba analýzy, ale klesá počet teoretických pater.

Postupně byly testovány tyto teplotní parametry analýzy:

- Teplotní program: konstantní teplota 210 °C
- Teplotní program: konstantní teplota 220 °C
- Teplotní program: konstantní teplota 230 °C
- Teplotní program: konstantní teplota 240 °C
- Teplotní program: 220 °C, 1 minutu; vzestupný gradient 2 °C za minutu do 240 °C
- Teplotní program: 210 °C, 1 minutu; vzestupný gradient 2 °C za minutu do 230 °C
- Teplotní program: 210 °C, 1 minutu; vzestupný gradient 2 °C za minutu do 240 °C
- Teplotní program: 120 °C, 2 minuty; vzestupný gradient 10 °C za minutu do 220 °C

Teplotní limit kolony byl 250 °C [59]. Maximální možný nastavitelný průtok byl 1,5 ml·min⁻¹. Doba analýzy se od původního průtoku 1,2 ml·min⁻¹ nelišila, proto v parametrech není průtok uveden. U uvedených teplotních programů nedošlo k výraznějšímu zkrácení doby analýzy ani optimalizaci, proto byly pro analýzu použity původní parametry.

4.2 Ověření metrologických charakteristik metody

4.2.1 Standard č. 1

Pro stanovení vybraných validačních parametrů byl nejprve použit standard methylesteru kyseliny linolové (kyselina *cis*-9, *cis*-12 oktadekadienová). Chromatogram LA je uveden v příloze 1.

4.2.1.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vypočtena z 5-ti měření. Proměřován byl neřaděný standard o koncentraci 0,22 mg·ml⁻¹. Odlehlé hodnoty byly vyloučeny. Průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka byly počítány dle vzorců u vedených výše a to 1, 2 a 3.

Tabulka 4.1: Opakovatelnost metody

| Číslo měření | Plocha píku [mV·s] |
|--|--------------------|
| 1 | 2285480 |
| 2 | 2370199 |
| 3 | 2367629 |
| 4 | 2103532 |
| 5 | 2134116 |
| Průměr | 2252191,20 |
| Směrodatná odchylka | 113491,13 |
| Relativní směrodatná odchylka [%] | 5,04 |

Metoda je opakovatelná, pokud relativní směrodatná odchylka všech výsledků, získaných ve stejné laboratoři stejným pracovníkem podle stejného pracovního postupu provedená v krátkém časovém intervalu, nepřesáhne hodnotu 10 % [58]. Relativní směrodatná odchylka naměřených dat činí 5,04 %, což znamená, že metoda je opakovatelná a tudíž vhodná pro stanovení kyseliny linolové.

4.2.1.2 Linearita

Linearita byla zjištěna proměřením sedmi různě koncentrovaných roztoků standardu. Standard byl ředěn n-heptanem. Každá koncentrace byla proměřena minimálně 2x a tyto naměřené hodnoty ploch i výšek pík byly zprůměrovány.

Výpočet koncentrace:

$$C \text{ (původního standardu)} = 0,22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$V \text{ (standardu)} = 0,020 \text{ ml}$$

$$V \text{ (n-heptanu)} = 0,080 \text{ ml}$$

$$0,22 \text{ mg} \dots\dots\dots 1 \text{ ml}$$

$$\underline{x \text{ mg} \dots\dots\dots 0,02 \text{ ml}}$$

$$x = 0,0044 \text{ mg v } 0,02 \text{ ml} + 0,08 \text{ ml n-heptanu}$$

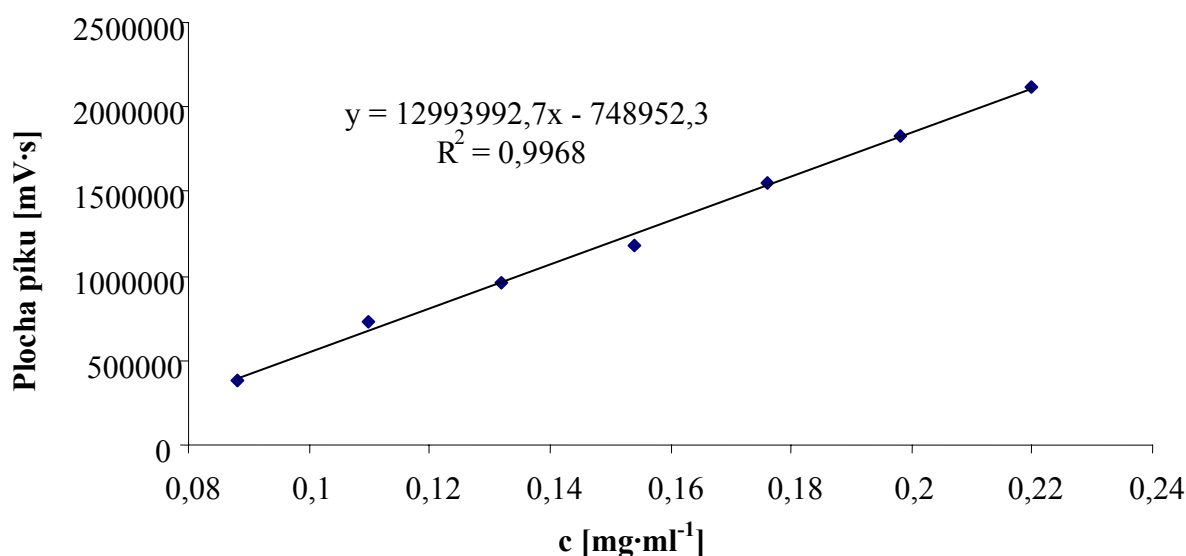
$$\begin{array}{rcl}
 0,0044 \text{ mg v } 0,02 \text{ ml} + 0,08 \text{ ml n-heptanu} & \rightarrow & 0,0044 \text{ mg} \dots\dots\dots 0,1 \text{ ml} \\
 & & \underline{x \text{ mg} \dots\dots\dots 1 \text{ ml}} \\
 & & x = 0,044 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}
 \end{array}$$

Tabulka 4.2: Plochy a výšky píků v závislosti na koncentraci

| c [mg·ml ⁻¹] | Průměrná plocha píku [mV·s] | Průměrná výška píku |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 0,044 | 192335,5 | 2597,5 |
| 0,066 | 334758,5 | 4432,0 |
| 0,088 | 383310,5 | 5891,5 |
| 0,11 | 728333,5 | 11390,0 |
| 0,132 | 962769,0 | 14991,0 |
| 0,154 | 1185780,0 | 18552,0 |
| 0,176 | 1554487,0 | 25583,5 |
| 0,198 | 1831354,0 | 28616,0 |
| 0,22 | 2118824,6 | 33629,0 |

Z hodnot uvedených v tabulce 4.2 byl sestrojen v programu Microsoft Excel bodový graf. Tyto body byly proloženy lineární spojnici trendu. Dále byla zobrazena rovnice regrese y a hodnota spolehlivosti R^2 .

Graf 1: Závislost plochy píku na koncentraci



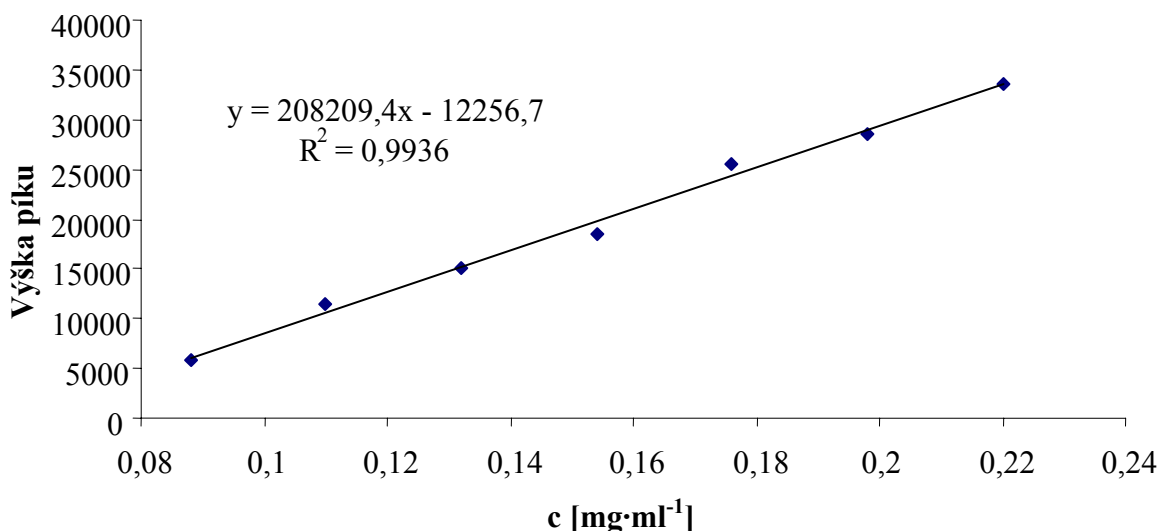
Jak už bylo uvedeno výše, hodnota korelačního koeficientu nesmí klesnout pod hodnotu 0,98. Závislost plochy píku na koncentraci má hodnotu spolehlivosti 0,9968, to znamená, že linearita je dobrá a metodu lze použít pro kvantifikaci.

4.2.1.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Ke stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti potřebujeme znát směrnici kalibrační přímky b z rovnice regrese $y = a + bx$, vycházející ze závislosti výšky píku na koncentraci viz. graf 2. Data potřebná k sestrojení grafu jsou uvedeny v tabulce 4.2.

U nejnižší koncentrace (tj. $0,044 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) bylo určeno ze základního šumu detektoru maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku.

Graf 2: Závislost výšky píku na koncentraci



Výpočet meze detekce:

Šum na základní linii: $h_n = 351$

Směrnice kalibrační přímky: $m = 208209,4$

$$\text{LOD} = 3 \cdot \frac{h_n}{m} = \underline{0,0051 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}} = 5,1 \cdot 10^{-6} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$$

Výpočet meze stanovitelnosti:

Šum na základní linii: $h_n = 351$

Směrnice kalibrační přímky: $m = 208209,4$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{h_n}{m} = \underline{0,0169 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}} = 1,69 \cdot 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$$

Ze zjištěných hodnot LOD a LOQ plyne, že plynová chromatografie s FID detektorem je dostatečně citlivá pro stanovení nízkých koncentrací kyseliny linolové v různých typech maticí.

4.2.2 Standard č. 2

Vzhledem k tomu, že nás zajímala především možnost stanovení CLA, jako další byl použit standard methylesteru konjugované kyseliny linolové. Na rozdíl od kyseliny linolové jsou zde dvojné vazby odděleny jen jednou jednoduchou vazbou a prostorové uspořádání na jedné z dvojných vazeb je změněno z původního *cis*- na *trans*-.

Při GC analýze tohoto standardu (o koncentraci $250 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) došlo pravděpodobně k rozdělení píku na 3 části ač se jednalo o jeden izomer. I přes to byly stanoveny metrologické parametry metody. Chromatogram CLA je uveden v příloze 2.

4.2.2.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena po zředění standardu n-heptanem na koncentraci 0,025 mg·ml⁻¹. Tato koncentrace byla proměřena 5x. Průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka byly počítány dle vzorců uvedených výše (1, 2 a 3) pro každý pík zvlášť.

Tabulka 4.3: Opakovatelnost metody

| Číslo měření | 1.pík | | 2.pík | | 3.pík | |
|----------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|
| | Retenční čas | Plocha píku [mV·s] | Retenční čas | Plocha píku [mV·s] | Retenční čas | Plocha píku [mV·s] |
| 1 | 31,31 | 245580 | 31,54 | 264971 | 32,4 | 64028 |
| 2 | 31,33 | 238200 | 31,57 | 265732 | 32,43 | 66726 |
| 3 | 31,36 | 234062 | 31,6 | 279275 | 32,47 | 66566 |
| 4 | 31,33 | 241496 | 31,57 | 278247 | 32,41 | 62098 |
| 5 | 31,32 | 241017 | 31,56 | 281252 | 32,41 | 62693 |
| Průměr | 31,33 | 240071 | 31,568 | 273895,4 | 32,424 | 64422,2 |
| SD | 0,0167 | 3817,94 | 0,0194 | 7046,731 | 0,02498 | 1920,9792 |
| RSD [%] | 0,0534 | 1,590338 | 0,0614 | 2,572782 | 0,0770417 | 2,981859 |

Jelikož maximální hodnota RSD je 2,98 % tzn., že nepřesáhla hodnotu 10 %, můžeme říci, že je metoda opakovatelná.

4.2.2.2 Linearita

Pro stanovení linearity byla koncentrace použita pro opakovatelnost ($c = 0,025 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) dále ředěna na nižší koncentrace n-heptanem. Z dat uvedených v tabulce 4.4 byla sestrojena kalibrační přímka a následovně byla zobrazena rovnice regrese a hodnota spolehlivosti.

Výpočet koncentrace:

$$C \text{ (standardu ředěného 10 000x)} = 0,025 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$V \text{ (standardu)} = 0,020 \text{ ml}$$

$$V \text{ (n-heptanu)} = 0,080 \text{ ml}$$

$$0,025 \text{ mg} \dots\dots\dots 1 \text{ ml}$$

$$x \text{ mg} \dots\dots\dots 0,09 \text{ ml}$$

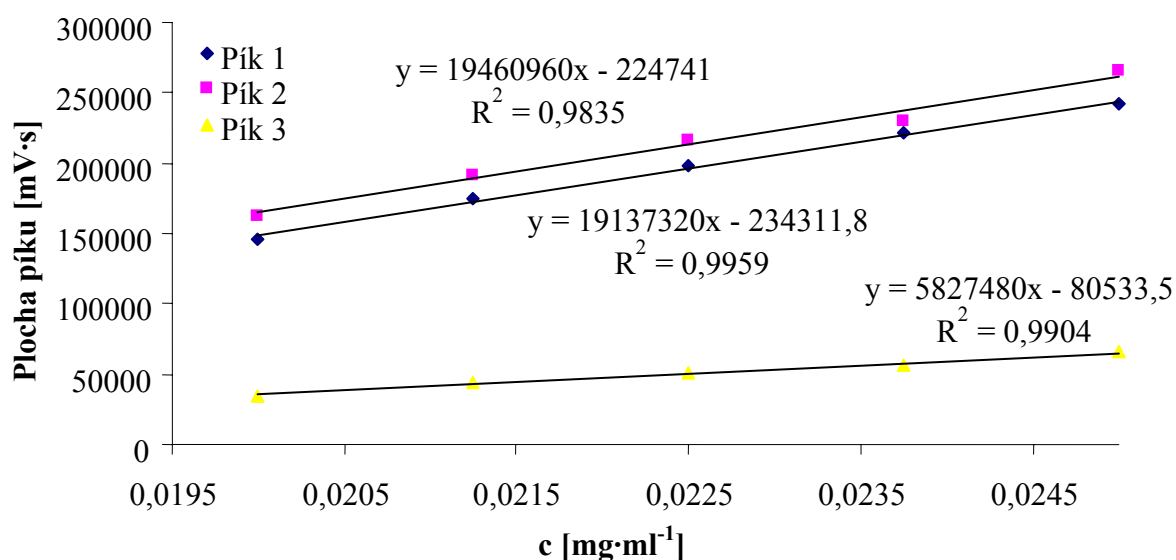
$$x = 0,00225 \text{ mg v } 0,09 \text{ ml} + 0,01 \text{ ml n-heptanu} \rightarrow 0,00225 \text{ mg} \dots\dots\dots 0,1 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{r} x \text{ mg} \dots\dots\dots 1 \text{ ml} \\ \hline x = 0,0225 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \end{array}$$

Tabulka 4.4: Plochy a výšky píků v závislosti na koncentraci

| c [mg·ml ⁻¹] | Průměrná plocha píku [mV·s] | | | Průměrná výška píku | | |
|--------------------------|-----------------------------|----------|---------|---------------------|--------|-------|
| | 1.pík | 2.pík | 3.pík | 1.pík | 2.pík | 3.pík |
| 0,0200 | 145533,5 | 162705,5 | 34944,5 | 1602,5 | 1703,0 | 352,5 |
| 0,0213 | 174380,5 | 191494,0 | 44635,0 | 1868,5 | 2023,0 | 409,5 |
| 0,0225 | 198701,5 | 216638,0 | 51354,0 | 2193,0 | 2314,5 | 493,0 |
| 0,0238 | 220884,0 | 229464,0 | 56613,5 | 2382,5 | 2537,5 | 600,5 |
| 0,0250 | 241890,0 | 265351,5 | 65377,0 | 2681,5 | 2882,0 | 637,5 |

Graf 3: Závislost plochy píku na koncentraci

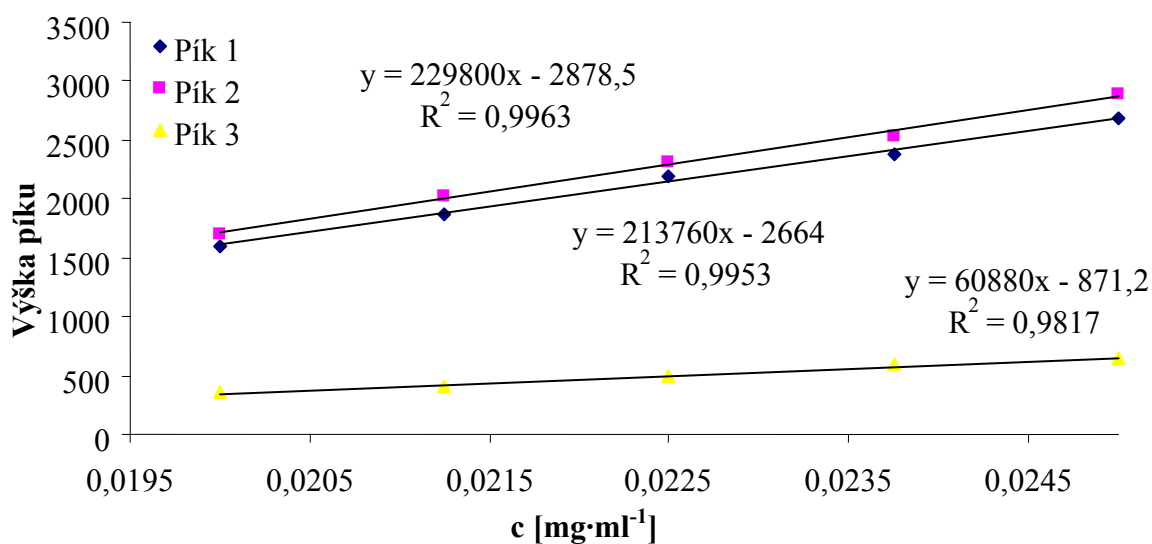


Z korelačních koeficientů R^2 plyne, že linearita metody je dobrá, protože všechny korelační koeficienty jsou vyšší jak hodnota 0,98 %.

4.2.2.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla vypočtena pomocí směrnice kalibrační přímky a dále byla zhodnocena citlivost metody.

Graf 4: Závislost výšky píku na koncentraci



Výpočet meze detekce pro 1. pík:

Šum na základní linii: $h_n = 547$

Směrnice kalibrační přímky: $m = 213760$

$$\text{LOD} = 3 \cdot \frac{h_n}{m} = \underline{0,0077 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}} = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Výpočet meze stanovitelnosti pro 1.pík:

Šum na základní linii: $h_n = 547$

Směrnice kalibrační přímky: $m = 213760$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{h_n}{m} = \underline{0,0256 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}} = 2,56 \cdot 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$$

Tabulka 4.5: Meze detekce a stanovitelnosti

| Izomer | m | LOD [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] | LOQ [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] |
|--------|--------|--|--|
| 1 | 213760 | 0,0077 | 0,0256 |
| 2 | 229800 | 0,0071 | 0,0238 |
| 3 | 60880 | 0,0270 | 0,0899 |

Mez detekce je v rozmezí koncentrací 0,0071–0,0270 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a mez stanovitelnosti je v rozmezí koncentrací 0,0238–0,0899 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ to znamená, že metoda plynové chromatografie s FID detektorem je dostatečně citlivá, ale protože došlo k rozdělení píků na 3 části, tak nelze konstatovat, že je vhodná pro kvantitativní stanovení CLA.

4.2.3 Vzorek CLA

Vybraná metoda byla použita pro orientační kvalitativní stanovení konjugované kyseliny linolové a dalších MK ve vzorku CLA značky Vitaland (komerční přípravek na hubnutí). MK byly nejprve převedeny na methylestery esterifikací methanolem za alkalické katalýzy KOH (viz kapitola 3.3.2). Množství izolovaného vzorku činilo 9,1052 g. Vzorek byl proměřen a srovnán se standardem směsi MEMK proměřeným za stejných podmínek viz. *tabulka 4.6*.

Kvalitativní stanovení mastných kyselin

Pro identifikaci dalších MK přítomných ve vzorku byl použit standard směsi MEMK. Ve standardu bylo obsaženo celkem 30 mastných kyselin. Jejich seznam, společně s retenčními časy, je zaznamenán v *tabulce 4.6*.

Tabulka 4.6: Standard MEMK

| Kyselina | Popis molekuly MK | Rt [min] | Kyselina | Popis molekuly MK | Rt [min] |
|---------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|
| Kapronová | C6:0 | 14,59 | Elaidová | C18:1 n9t | 28,42 |
| Kaprylová | C8:0 | 16,14 | Olejová | C18:1 n9c | 28,58 |
| Kaprinová | C10:0 | 18,59 | Linolelaidová | C18:2 n6t | 29,28 |
| Undekanová | C11:0 | 19,90 | Linolová | C18:2 n6c | 31,14 |
| Laurová | C12:0 | 20,95 | Arachová | C20:0 | 31,61 |
| Tridekanová | C13:0 | 22,23 | γ -linolenová | C18:3n6 | 32,18 |
| Myristová | C14:0 | 23,22 | Eicosenová | C20:1 | 32,45 |
| Myristolejová | C14:1 n9c | 23,79 | Linolenová | C18:3 | 32,69 |
| Pentadekanová | C15:0 | 23,98 | Heneicosanová | C21:0 | 33,62 |
| Pentadecenová | C15:1 | 24,64 | Eicosadienová | C20:2 | 34,31 |
| Palmitová | C16:0 | 25,59 | Behenová | C22:0 | 35,02 |
| Palmitolejová | C16:1 n9c | 25,97 | Eicosatrienová 6 | C20:3n6 | 35,32 |
| Heptadekanová | C17:0 | 26,29 | Eruková | C22:1n9 | 35,83 |
| Heptadecenová | C17:1 | 27,73 | Eicosatrienová 3 | C20:3n3 | 36,17 |
| Stearová | C18:0 | 28,33 | Arachidonová | C20:4n6 | 36,53 |

Podle retenčních časů jednotlivých píků byly identifikovány ve vzorku tyto mastné kyseliny: kaprylová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová, linolelaidová, linolová a γ -linolenová. Analýza vzorku i standardu MEMK probíhala za stejných podmínek. Z chromatogramu MK ve vzorku, který je uveden v *příloze 3* je zřejmé že pravděpodobně došlo opět k rozdělení CLA, stejně jako u standardu č. 2.

Při delším setrvání vzorku v dávkovači se může změnit jeho složení, obsahuje-li látky náchylné ke konverzi nebo rozkladu za vyšších teplot. V takových případech je lepší otvírat dělič na malý průtok, např. 1:100, čímž se zkrátí pobyt vzorku v dávkovači, a tím zmenší nebo zcela vyloučí změny ve velikosti píků. Nebo se ke vzorku přidává navíc látka, která přednostně obsadí aktivní povrch a vzorek projde bez úhony do kolony. Nejlépe je používat dávkovače skleněné a deaktivované např. hexamethylenem disilasanem.

Další nevýhodou kapilárních kolon jsou velké objemy rozpouštědel, které mohou kondenzovat v koloně a měnit tak vlastnosti stacionární fáze, čímž se změni retenční hodnoty v závislosti na těkavosti a polaritě rozpouštědla a složek [45]. Rozložení CLA na několik píků mohlo být tedy způsobeno delším setrváním vzorku v dávkovači.

5 ZÁVĚR

Konjugovaná kyselina linolová je přírodní složka potravin živočišného původu vyskytující se v největší míře v masu a mléku volně se pasoucích přežvýkavců. CLA je velice zajímavá především svými zdraví prospěšnými účinky. Dnes je propagována hlavně jako prostředek na hubnutí s tou výhodou, že zabraňuje tzv. jojo efektu. To znamená, že po snížení hmotnosti nedochází k opětovnému přibírání na váze. S nadváhou bývá spojované onemocnění diabetes typu II, které pravděpodobně CLA také potlačuje. Mezi další potenciální pozitivní účinky na lidský organismus patří antikarcinogenní a antioxidační účinky. Údajně také potlačuje vznik atherosklerózy a posiluje imunitní systém. Pokusy však byly prováděny především na zvířatech, proto jsou účinky na lidský organismus diskutabilní.

Ale i přes zmíněné pochybnosti se uvažuje o obohacování potravin CLA a v současnosti jsou již k dispozici potravinové suplementy určené zejména na hubnutí. Zajímavé také je, že izomery této kyseliny mají různé účinky. Hlavní jsou izomery *trans*-10, *cis*-12 a *cis*-9, *trans*-11. Co se nežádoucích účinků týče, tak zatím bylo zjištěno pouze hromadění tuku v játrech a snížený obsah bílkovin v těle. Z tohoto důvodu se nedoporučuje dlouhodobé užívání CLA. Pro stanovení CLA v různých typech matric byla v této práci testována plynová chromatografie. Součástí experimentální práce byla nejprve snaha o optimalizaci pracovních podmínek, zejména o nalezení vhodného teplotního programu. Pro další analýzy byl zvolen program, který poskytoval kvalitní píky a doba analýzy byla přijatelně dlouhá (38 minut). Pro eventuální potřebu rozdělení jednotlivých izomerů CLA bude třeba teplotní program dále optimalizovat.

Základní validační parametry metody byly stanoveny s použitím dvou typů standardů: methyl linoleátu (standard č. 1) a methyl esteru konjugované linolové kyseliny (standard č. 2).

Vhodnost této metody pro stanovení MEMK byla jako první ověřena pomocí methyl linoleátu. Na základě výsledků metrologických charakteristik metody (kap. 4.1.2) bylo potvrzeno, že dané podmínky jsou vhodné pro stanovení linolové kyseliny. Opakovatelnost i linearita byla dobrá (RSD z pěti měření 5,04 %, $r^2=0,9968$), LOD byl stanoven na $5,1 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Protože LA a CLA se od sebe liší pouze polohou vazeb, dalo by se předpokládat, že optimální podmínky pro stanovení LA budou vhodné také pro stanovení CLA. Nicméně po proměření methyl esteru konjugované linolové kyseliny byly z chromatogramu zřejmé 3 píky ač se jednalo o jeden izomer. I přes to byly zjišťovány validační parametry metody (RSD < 2,98 %, $r^2>0,98$, LOD < $0,027 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a po jejich posouzení bychom mohli konstatovat, že je metoda vhodná. Ale na základě chromatogramu č.2, kde je vidět rozložení píku, tohle tvrzení nelze potvrdit. Dávkování bez děliče toku je sice vhodné pro analýzy s teplotním programem, ale jeho nevýhodou, která by mohla způsobit rozložení píků, je případ, kdy obsahuje látky náchylné ke konverzi nebo rozkladu za vyšších teplot. Delším setrváním vzorku v dávkovači se může změnit jeho složení.

Vybraná metoda byla aplikována při stanovení obsahu MK a pravděpodobně také CLA z tobolek komerčního výrobku na hubnutí značky Vitaland. Z chromatogramu je zřejmé, že v oblasti stejného retenčního času jako byl u standardu č. 2. se nachází opět nedokonale rozdělený pík. Na základě toho byl tento pík považován za CLA. Ostatní MK byly identifikovány srovnáním se standardem směsi MEMK.

Na závěr můžeme z daných výsledků usoudit, že metoda GC za daných podmínek je vhodná ke stanovení kyseliny linolové, ale není optimální pro stanovení CLA. Proto je třeba se optimalizací metody zabývat v další navazující práci.

6 LITERATURA

- [1] Výskumný ústav potravinársky: *Trendy v potravinárstve*, 2007, roč. 14, č. 3, s. 26-27. ISSN 1336-085X.
- [2] Marounek, M.: *Konjugovaná kyselina linolová v živočišných produktech: souvislost s výživou zvířat a zdravím lidí* [online]. březen 2007 [cit. 21.2.2009]. Dostupný z [www: <http://www.vuzv.cz/old/vyziva/studie27.doc>](http://www.vuzv.cz/old/vyziva/studie27.doc).
- [3] Mach, I.: *Doplňky stravy*. 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2004. ISBN 80-86320-34-0.
- [4] Wildman, R. E. C.: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Food*. USA: CRC Press, 2001, ISBN 0-8493-8734-5.
- [5] Velíšek, J.: *Chemie potravin I*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 352 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [6] Velíšek, J.: *Chemie potravin II*. 2. upravené vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.
- [7] Pánek, J., Pokorný, J., Dostálová, J.: *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 219 s. ISBN 80-7080-468-8.
- [8] Fennema, O. R.: *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. ISBN 0-8247-9691-8.
- [9] Kopečný, Jan.: Konjugovaná kyselina linolová – je skutečně tak důležitá?. *Biochem J* [online]. 2004, roč. 29 [cit. 3.4.2009]. Dostupný z [www: <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&akce=showall&clanek=867&id_c=8578>](http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&akce=showall&clanek=867&id_c=8578).
- [10] Kalač, P.: *Funkční potraviny - kroky ke zdraví*. České Budějovice: Dona, 2003. 132 s. ISBN 80-7322-029-6.
- [11] CLA - konjugovaná kyselina linolová [online]. 02. 02. 2005 [cit. 26.2.2009]. Dostupný z [www: <http://www.musculus.cz/kulturistika1/phprs/view.php?cislocclanku=2005020201>](http://www.musculus.cz/kulturistika1/phprs/view.php?cislocclanku=2005020201).
- [12] Harnol, L.: *CLA Ethyl Ester* [online]. 21.9.2008 [cit. 3.3.2009]. Dostupný z [www: <http://spinning.fitvyziva.cz/produkty-z-naseho-eshopu/cla-ethyl-ester.html>](http://spinning.fitvyziva.cz/produkty-z-naseho-eshopu/cla-ethyl-ester.html).
- [13] Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S., Shimizu, S.: CLA production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003, vol. 80, no. 9. ISSN 1558-9331.
- [14] Kellens, M.J., Goderis, H.L., Tobback, P.P.: Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by a mixed culture of rumen microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1986, pp. 1268-1276.
- [15] Jaakola, S., Vahvaselkä, M., Laakso, S.: Effect of CLA on the cellular lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005, vol. 82, no 10. pp. 745-748. ISSN 1558-9331.
- [16] Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., Fernandes, G.: Biological effects of conjugated linoleic acid in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 17, 2006, pp. 789-810.
- [17] De Deckere, E.A., Van Amelsvoort, J.M., McNeil, G.P., Jones, P.: Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.* 82, 1999, pp. 309-317.
- [18] Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S. et al.: Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 2004, pp. 614-620.
- [19] Belury, M.A.: Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 2002, pp. 505-531.

- [20] Kim, E.J., Holthuizen, P.E., Park, H.S., Ha, Y.L., Jung, K.C., Park, J.H.: *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, 2002, G357.
- [21] Ip, C., Briggs, S.P., Haeghele, A.D., Thompson, J., Storkson, J., and Scimeca, J.A., The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet, *Carcinogenesis*, 17, 1996, pp. 1045–1050.
- [22] Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., and Pariza, M.W., Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivate of linoleic acid, *Cancer Res.* 51, 1991, pp. 6118–6124.
- [23] Salminen, I., Mutanen, M., Jauhiainen, M., and Aro, A., Dietary trans fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum, *J. Nutr. Biochem.*, 9, 1998, pp. 93–98.
- [24] Fritsche, J., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P., Roach, J. A. G., Sehat, N., Ku, Y., Steinhart, H.: Conjugated linoleic acid (CLA) isomers in human adipose tissue. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 1997, vol. 205, no. 6, ISSN 1431-4630.
- [25] Holm, F. *Konjugovaná kyselina linolová ve funkčních potravinách* [online]. 2002 [cit. 2009-02-21]. Dostupný z www: <<http://flairflow4.vscht.cz/SME30.doc>>.
- [26] Gurka, P. *Myslivecká abeceda* [online]. [cit. 2009-04-30]. Dostupný z www: <<http://myslivost.wz.cz/abeceda.html>>.
- [27] Shantha, N.C., Crum, A.D., Decker, E.A.: Evaluation of conjugated linoleic-acid concentrations in cooked beef. *J. Agr. Food Chem.* 42, 1994, pp. 1757-1760.
- [28] Shantha, N.C., Ram, L.N., O'Leary, J., Hicks, C.L., Decker, E.A.: Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *J. Food Sci.* 60, 1995, pp. 695-697.
- [29] Kobayashi, T., Nagao, T., Watanabe, Y., Yamauchi-Sato, Y., Negishi, S. and Shimada, V.: Enrichment of CLA isomers by selective esterification with L -menthol using *Candida rugosa* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, vol. 83, no. 2, pp. 93–99. ISSN 1558-9331.
- [30] Gaullier, J. M., Berven, G., Blankson, H., Gudmundsen O.: Clinical Trial Results Support a Preference for Using CLA Preparations Enriched with Two Isomers Rather Than Four Isomers in Human Studies. *Lipids*, 2002, vol. 37, no. 11. ISSN 1558-9307.
- [31] Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D., and Pariza, M.W., Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets, *J. Dairy Sci.* 82, 1999, pp. 2146–2156.
- [32] Loor, J.J., Herbein, J.H.: Alterations in blood plasma and milk fatty acid profiles of lactating Holstein cows in response to ruminal infusion of a conjugated linoleic acid mixture. *Anim. Res.* 50, 2001, pp. 463-476.
- [33] Lin, T.Y.: Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* with additions of different fatty acids. *Food Chem.* 94, 2006, pp. 437-441.
- [34] Enser, M., Scollan, N.D., Choi, N.J., Kurt, E., Hallett, K., Wood, J.D., Effect of dietary lipid on the content of conjugated linoleic acid (CLA) in beef muscle, *Anim. Sci.*, 69, 1999, pp. 143–146.
- [35] Thiel-Cooper, R.L., Parrish, F.C.Jr., Sparks, J.C., Wiegand, B.R. Ewan, R.C.: Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J Anim Sci.* 79, 2001, pp. 1821-1828.

- [36] Smith, S.B., Hively, T.S., Cortese, G.M., Han, J.J., Chung, K.Y., Casteñada, P., Gilbert, C.D., Adams, V.L. Mersmann, H.J.: Conjugated linoleic acid depresses the Δ^9 desaturase index and stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity in porcine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 80, 2002, pp. 2110-2115.
- [37] Raes, K., Huyghebaert, G., De Smet, S., Nollet, L., Arnouts, S., and Demeyer, D.: The deposition of conjugated linoleic acids in eggs by laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. *J. Nutr.* 132, 2002, pp. 182-189.
- [38] Husvéth, F., Kovács, G., Wágner, L., and Pál, P.: Effect of dietary conjugated linoleic acid on the fatty acid composition of egg yolk, liver and adipose tissue in laying hens. *Arch Geflügelk* 69, 2005, pp. 213-218.
- [39] Twibell, R.G., Watkins, B.A., Rogers, L., and Brown, P.B., Effects of dietary conjugated linoleic acids on hepatic and muscle lipids in hybrid striped bass, *Lipids*, 35, 2000, pp. 155–161.
- [40] Jung, M.Y. and Ha, Y.L., Conjugated linoleic acid isomers in partially hydrogenated soybean oil obtained during nonselective and selective hydrogenation processes, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999, pp. 704–708.
- [41] Kadlec, P. a kol.: *Technologie potravin II.* 2. vyd. VŠCHT Praha, 2007. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [42] Foltz, A. K., Yeransian, J. A., Sloman K. G.: *Analytical Chemistry Reviews*, 1983, vol. 55, no. 5, pp. 174, ISSN 0003-2700.
- [43] Blaško, J., Kubinec, R., Pavlíková, E., Krupčík, J., Soják, L.: On the chemometric deconvolution of gas chromatographically unseparated *trans*-7,*cis*-9, *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-8,*cis*-10 octadecadienoic acid isomers in ewe and cow milks. *Journal of food and Nutrition Research*, 2008, vol. 47, no. 1, pp. 29-36, ISSN 1336-8672.
- [44] Uehara, H., Suganuma, T., Negishi, S., Ueno, S., Sato, K.: A novel method for solvent fractionation of two CLA isomers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, vol.83, no.3, pp. 261-267. ISSN 1558-9331.
- [45] Tesařík, K., Komárek, K.: *Kapilární kolony v plynové chromatografii. Knižnice technických aktualit.* 1. vyd. Praha: SNTL, 1984. 184 s.
- [46] Klouda, P.: *Moderní analytické metody.* 2. upravené a doplněné vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [47] Tissue, B.M. *Gas Chromatography*. [online]. 1996, poslední revize 13. června 1996 [cit. 6.1.2009]. Dostupné z: <<http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/gc/gc.htm>>.
- [48] Churáček, J. a kol.: *Analytická separace látek.* 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [49] Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II.* 1. vyd. Brno: VUT, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [50] ÚCHPBT. Praktikum z analytické chemie potravin. Pracovní sešit. Brno: VUTIUM, 2002.
- [51] Doškářová, Š.: *Zajištění kvality analytických výsledků: Sborník přednášek ze seminářů 19. – 21.3. 2001 a 11. – 13.3.2002 v Komorní Lhotce.* Český Těšín: 2 THETA, 2002. 308 s. ISBN 80-86380-11-4.
- [52] Validační program pro statistické zpracování analytických dat [online]. poslední revize 29.5.2008 [cit. 2009-04-06]. Dostupný z [www: <http://www.hplc.cz/Validace/index.htm>](http://www.hplc.cz/Validace/index.htm).

- [53] Terminologie [online]. 2003 [cit. 2009-04-06]. Dostupný z [www: <http://www.eqa.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>](http://www.eqa.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm).
- [54] Volka K. a kol.: *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN: 80-7080-227-8.
- [55] Doerffel, K., Eckschlager, K.: *Optimální postup chemické analýzy*. 2. doplněné vyd. Praha: SNTL, 1988. 280 s.
- [56] Sommer, L.: *Teoretické základy analytické chemie III*. 1. vyd. Brno: VUT, 1995. 102 s. ISBN 80-214-0660-7.
- [57] Mez detekce a mez stanovitelnosti [online]. 22. ledna 2009 [cit. 2009-04-09]. Dostupné z [www: <http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm>](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm).
- [58] Macků, I. *Analýza mastných kyselin v čokoládě metodou plynové chromatografie*. [Diplomová práce] Brno: VUT FCH , ústav PCHBT, vedoucí Ing. Eva Vítová, Ph.D., 2006. 65 s.
- [59] Nabídkový katalog firmy SUPELCO, 1994.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|------------------|--|
| CLA | konjugovaná kyselina linolová |
| LDL | lipoproteiny nízké hustoty |
| HDL | lipoproteiny vysoké hustoty |
| MK | mastné kyseliny |
| LA | kyselina linolová |
| TAG | triacylglycerol |
| VLDL | lipoproteiny velmi nízké hustoty |
| DMBA | 7,12-dimethylbenz[α]anthracen |
| PGE ₂ | prostaglandin E ₂ |
| MEMK | methyl ester mastné kyseliny |
| PUFA | polynenasycené mastné kyseliny |
| DHA | kyselina dokosaheptaenová (22:6 n-3) |
| GC | plynový chromatograf |
| HPLC | vysoce účinný kapalinový chromatograf |
| TMG | tetramethylguanidin |
| FFAP | fáze pro volné mastné kyseliny (free fatty acids phase) |
| UV-VIS | ultrafialová viditelná spektroskopie |
| EIMS | elektronová ionizace s hmotnostní spektrometrií |
| DD-FTIR | přímé vložení-Fourierova transformace infračervené spektroskopie |
| DMOX | 4,4-dimethyloxazolin |
| NMR | nukleární magnetická resonance |
| TCD | tepelně vodivostní detektor |
| ECD | detektor elektronového záchytu |
| FID | plamenový ionizační detektor |
| TID | termoionizační detektor |
| AFID | plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem |
| SD | směrodatná odchylka |
| RSD | relativní směrodatná odchylka |
| LOD | mez detekce (limit of detection) |
| LOQ | mez stanovitelnosti (limit of quantitation) |

8 PŘÍLOHY

Příloha 1

Chromatogram methyl esteru kyseliny linolové

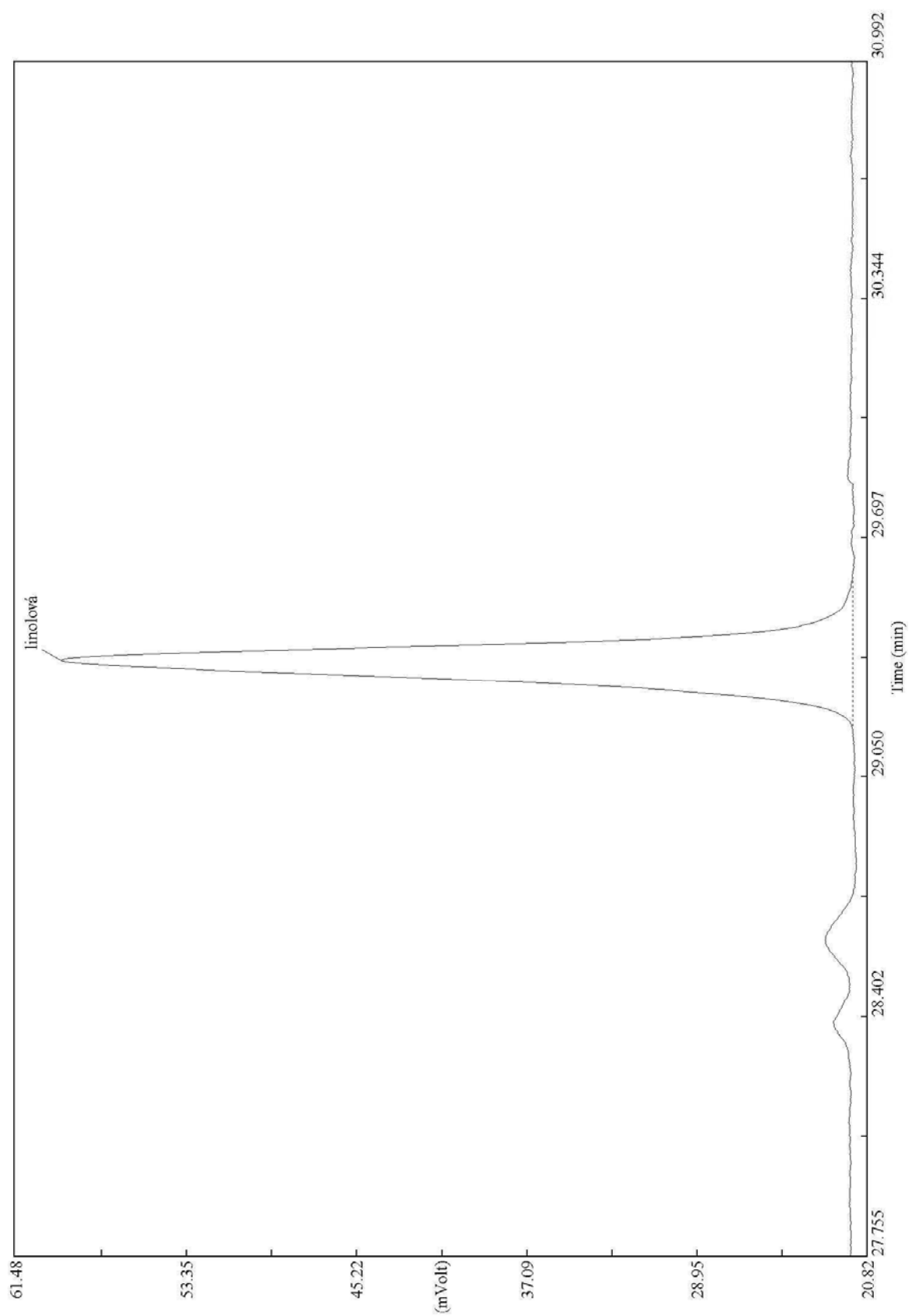
Příloha 2

Chromatogram methyl esteru CLA

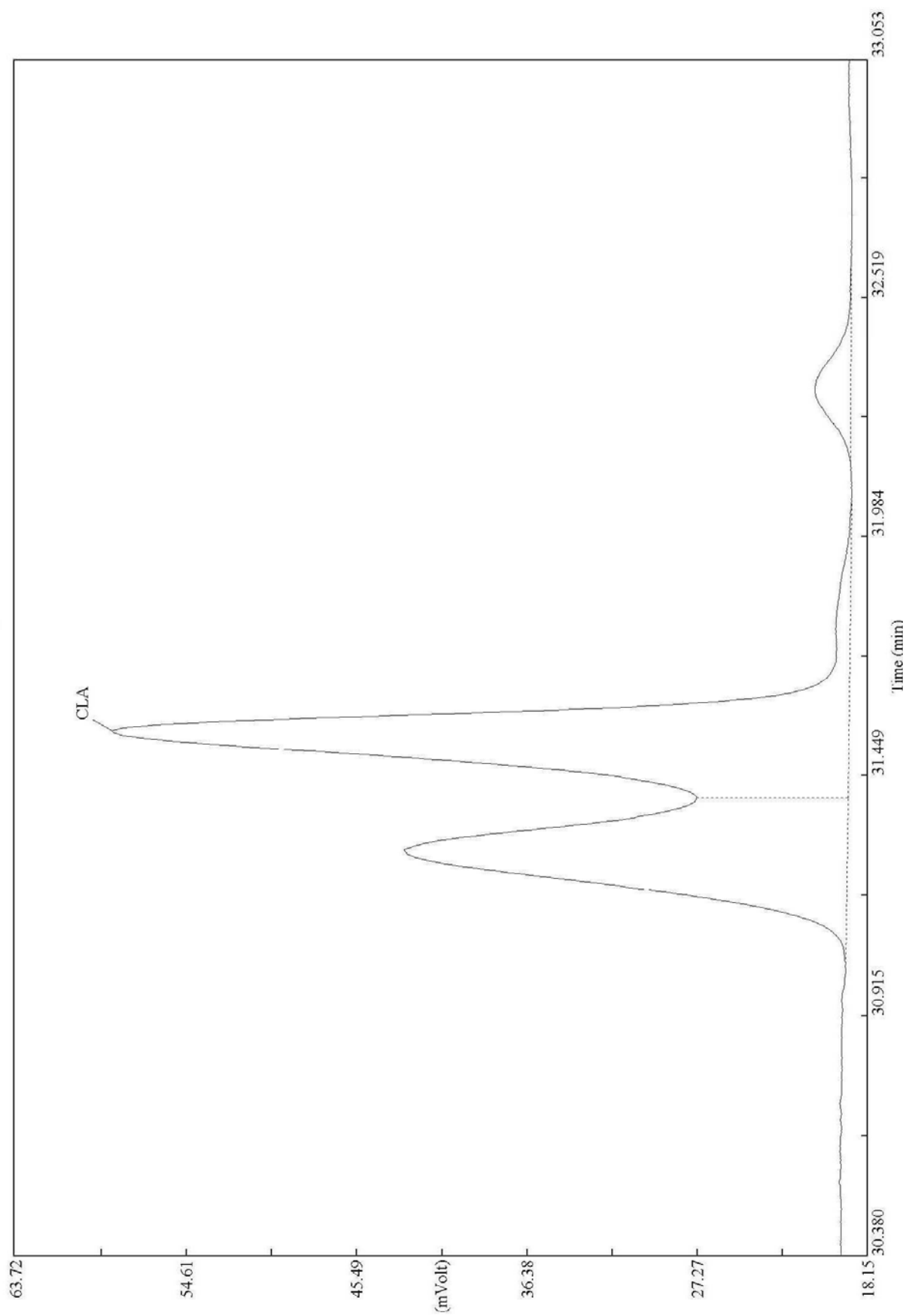
Příloha 3

Chromatogram MK izolovaných z tobolky CLA značky Vitaland

Příloha 1: Chromatogram methyl esteru kyseliny linolové



Příloha 2: Chromatogram methyl esteru CLA



Příloha 3: Chromatogram MK izolovaných z tobolky CLA značky Vitaland

